



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lara Čižmek

**ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
PRIRODNIH ANTIOKSIDANSA PRIMJENOM
VOLTAMETRIJSKIH TEHNIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Šebojka Komorsky-Lovrić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lara Čižmek

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NATURAL ANTIOXIDANTS USING VOLTAMMETRIC TECHNIQUES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Šebojka Komorsky-Lovrić, PhD

Zagreb, 2018

Zahvale

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Šebojki Komorsky-Lovrić, na mogućnosti izrade ovog doktorskog rada. Hvala Vam na svojoj stručnoj pomoći, usmjeravanju i vođenju kada je istraživanje išlo i u željenom i u neželjenom smjeru. Hvala Vam što ste me naučili razmišljati, primjenjivati naučeno znanje i samostalnom radu.

Iskreno hvala dr. sc. Milivoju Lovriću, koji je uz dr. sc. Šebojku Komorsky-Lovrić, bio glavni oslonac prilikom izrade ove doktorske disertacije. Hvala na trudu i uloženom vremenu te uvijek ugodnim razgovorima.

Hvala oboma što sam mogla kucati na vaša vrata i pitati bezbroj pitanja te vam se obratiti u bilo kojem trenutku.

Najljepše hvala dr. sc. Ivani Novak Jovanović što me prihvatila u eksperimentalni dio istraživanja i trpila sve moje greške, ispravke i upite te što sam se od početka osjećala kao dio tima. Hvala na ljubaznosti, susretljivosti i spremnosti na pomoć.

Veliko hvala upućujem dr. sc. Dijani Jadreško s kojom sam tri godine dijelila radni prostor. Hvala na bezbrojnim razgovorima, poslovne i privatne prirode, na svim savjetima, na utjehama, hrabrenju, smijanju, druženju i podršci!

Zahvaljujem i svim zaposlenicima Laboratorija za biotehnologiju u akvakulturi, predvođenim dr. sc. Rozelindrom Čož-Rakovac, jer su me od prvog dana prihvatili kao ravnopravnu članicu Laboratorija zbog čega svakodnevno sretna dolazim na radno mjesto.

Na kraju, veliko hvala „ekipi sa klupica“. Izrada ovog rada bi bila puno teža da nije bilo osoba koje su hrabrile, tješile, nasmijavale, uveseljavale i podizale atmosferu! Hvala vam svima!

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljicama koje su cijelo ovo vrijeme uz mene! Hvala vam što me ohrabrujete da uvijek idem više i dalje, da sama donosim odluke i što me u svima apsolutno podržavate.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Antioksidansi	3
2.1.1. Klasifikacija antioksidansa	7
2.2. Kapsaicinoidi	8
2.2.1. Osnovne značajke	8
2.2.2. Svojstva.....	12
2.3. Karotenoidi	16
2.3.1. Osnovne značajke	16
2.3.2. Podjela karotenoida.....	19
2.3.3. Svojstva.....	21
2.4. Elektrokemijske metode	33
2.4.1. Ciklička voltametrija.....	34
2.4.2. Pravokutnovalna voltametrija	36
2.4.3. Voltametrijske tehnike u analizi kapsaicinoida i karotenoida	38
3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. Kemikalije.....	40
3.2. Uzorci paprika, riba i ljuskara.....	40
3.3. Metode	41
3.3.1. Elektrokemijske metode	41
3.3.1.1. Voltametrija imobiliziranih mikrokristala.....	44
3.3.1.2. Voltametrija imobiliziranog mikrofilma	45
3.3.1.3. Voltametrija imobilizirane kapi	46
3.3.2. Spektrofotometrija	47
3.3.3. Ekstrakcija	47
3.3.3.1. Ekstrakcija kapsaicinoida iz uzoraka čili paprika	47
3.3.3.2. Ekstrakcija karotenoida iz morskih organizama	47

4. REZULTATI I RASPRAVA	50
4.1. Elektrokemijska karakterizacija kapsaicinoida.....	50
4.1.1. Voltometrija imobiliziranih mikrokristala kapsaicina	50
4.1.2. Analiza čili paprika pomoću voltametrije imobiliziranih mikrokristala.....	60
4.1.3. Analiza kapsaicina i čili paprika pomoću voltametrije imobiliziranih mikrofilmova	70
4.2. Elektrokemijska karakterizacija karotenoida.....	74
4.2.1. β -Karoten.....	74
4.2.1.1. Voltometrija imobiliziranih mikrokristala β -karotena.....	75
4.2.1.2. Voltometrija imobiliziranog mikrofilma β -karotena	78
4.2.2. Lutein	86
4.2.2.2. Voltometrija imobiliziranog mikrofilma luteina	87
4.2.3. Astaksantin	91
4.2.3.1. Voltometrija imobiliziranih mikrokristala astaksantina	91
4.2.3.2. Voltometrija imobiliziranog mikrofilma astaksantina.....	95
4.2.3.3. Voltometrija imobilizirane kapi astaksantina	104
4.3. Ekstrakcija	112
4.3.1. Ekstrakcija kapsaicinoida.....	112
4.3.2. Ekstrakcija karotenoida	113
4.4. Analiza morskih organizama pomoću elektrokemijskih tehnika.....	117
4.5. Spektrofotometrijska karakterizacija karotenoida	125
5. ZAKLJUČAK	130
6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	131
7. LITERATURNI IZVORI.....	135
8. ŽIVOTOPIS	XII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PRIRODNIH ANTIOKSIDANSA PRIMJENOM VOLTAMETRIJSKIH TEHNIKA

Lara Čižmek
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb, Hrvatska

Antioksidansi su spojevi od širokog značaja za očuvanje zdravlja i sprječavanje negativnih učinaka potaknutih ubrzanim načinom života. Cilj ovog doktorskog rada bio je razvoj i primjena brzih i jednostavnih voltametrijskih metoda za određivanje oksidacijskih potencijala antioksidansa prisutnih u biljkama i životinjama. Spojevi su analizirani elektrokemijski, cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom te spektrofotometrijski. Primijenjene su voltametrijske tehnike imobiliziranih mikrokristala, mikrofilma i mikrokapi čime je omogućeno određivanje lipofilnih spojeva u vodenom mediju. Za potrebe razvoja ovih metoda, dio istraživanja bio je fokusiran na karakterizaciju standarda (kapsaicina, β -karotena, astaksantina i luteina), a u drugom dijelu ispitala se primjena metoda u analizi namirnica biljnog i životinjskog porijekla (čili paprike, morski organizmi). Pomoću elektrokemijskih tehnika, u biljnim uzorcima (čili paprike) uspješno je kvantificirana ukupna količina kapsaicinoida. Razvijene tehnike omogućile su kvalitativnu analizu karotenoida u uzorcima riba, dok je u uzorcima škampa i kozica uspješno kvantificirana količina astaksantina.

(167 stranica, 64 slike, 10 tablica, 265 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: antioksidansi/ čili paprike/ elektrokemijske tehnike/ kapsaicinoidi/ karotenoidi/ morski organizmi.

Mentor: dr. sc. Šebojka Komorsky-Lovrić, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

Rad prihvaćen: 06.06.2018.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Davor Kovačević, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac, zn. savj., IRB, Zagreb
3. dr. sc. Ivana Novak Jovanović, v. zn. sur., IMI, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF NATURAL ANTIOXIDANTS USING VOLTAMMETRIC TECHNIQUES

Lara Čižmek

Ruder Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb, Croatia

Antioxidants are versatile molecules that are used in maintaining human health and preventing adverse effects of fast paced life. Aim of this doctoral thesis was development and application of fast and easy-to-use voltammetric method for determination of oxidation potentials of antioxidants present in plant and animal samples. Compounds were analyzed with cyclic and square-wave voltammetry, and with spectrophotometry. Voltammetry of immobilized microparticles, microfilms and microdroplets allowed determination of lipophilic compounds in aqueous media. First part was focused on the characterization of standards (capsaicin, β -caroten, astaxanthin and lutein), and the second part on implementing this methods in analysis of foodstuff (chili peppers, marine organisms). By using electrochemical techniques, the total number of capsaicinoids in chili peppers was successfully quantified. In the analysis of fish samples, carotenoids were qualitatively determined, while the amount of carotenoid astaxanthin in shrimp samples was successfully quantified.

(167 pages, 64 figures, 10 tables, 265 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: antioxidants/ capsaicinoids/ carotenoids/ chili peppers/ electrochemical techniques/ marine organisms.

Supervisor: Dr. Šeojka Komorsky-Lovrić, Senior Scientist

Thesis accepted: 06.06.2018.

Reviewers:

Dr. Davor Kovačević, Professor, PMF, Zagreb

Dr. Rozelindra Čož-Rakovac, Senior Scientist, IRB, Zagreb

Dr. Ivana Novak Jovanović, Senior Research Associate, IMI, Zagreb

1. UVOD

Danas su proizvodi bogati tvarima koje imaju pozitivan učinak na zdravlje od velikog interesa u prehrambenoj industriji. S obzirom da je naglasak na očuvanju kvalitete namirnica koje čovjek konzumira, važno je kroz procese prerade proizvoda biljnog i životinjskog porijekla očuvati njihovu nutritivnu vrijednost. Mnoga istraživanja potvrdila su važnost antioksidansa u očuvanju zdravlja te da konzumacija namirnica bogatih antioksidativnim spojevima može dovesti do brojnih pozitivnih učinaka, kao što je protuupalno i antikarcinogeno djelovanje.¹⁻⁴

Ovo istraživanje bilo je usmjereno na dvije skupine spojeva koje u posljednje vrijeme privlače sve više pažnje upravo zbog istraživanja koja su pokazala njihovu veliku antioksidativnu sposobnost. U čili paprikama koje su vrlo rasprostranjeni prirodni začini, kapsaicinoidi su spojevi koji su odgovorni za ljutinu, a ujedno su se pokazali i kao jaki antioksidansi.⁵ Karotenoidi, druga skupina spojeva od interesa, prisutni su u brojnim biljkama i životinjama. S obzirom na njihov lipofilni karakter, reakcijski mehanizam i mogućnosti ovih spojeva još nisu do kraja razjašnjeni, pogotovo ako se uzmu u obzir stanice u ljudskom tijelu. Danas se astaksantin spominje kao jedan od najjačih karotenoidnih antioksidansa, pa čak i kao najjači antioksidans općenito.⁶ Interes ovog istraživanja bilo je određivanje karotenoida u namirnicama životinjskog porijekla, prvenstveno ribama, jer ih one moraju unositi u organizam ishranom. S obzirom na kontrolu namirnica koje se nalaze na tržištu, bitno je osigurati odgovarajući unos hranjivih tvari prilikom uzgoja, a prerađivači trebaju osigurati očuvanje nutritivne vrijednosti prerađenih proizvoda.

Do danas su razvijene brojne metode za određivanje pojedinačnih antioksidansa, odnosno ukupnog antioksidativnog kapaciteta u hrani, pićima i biološkim uzorcima koje uključuju spektrofotometriju⁷, NMR spektroskopiju⁸, plinsku kromatografiju⁹ i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti¹⁰. Za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih antioksidansa najčešće se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) koja se odlikuje visokom osjetljivošću i selektivnošću, no sama tehnika ima i neke nedostatke kao što su složena priprema uzorka, nemogućnost detekcije svih analita unutar iste analize, složenost i dugotrajnost analize te skupa instrumentacija. Zbog toga se teži razvoju jednostavnije, ekonomski isplativije tehnike koja bi omogućila određivanje pojedinačnih antioksidansa u uzorcima biljnog i životinjskog porijekla.

Cilj: Cilj ovog doktorskog rada bio je razvoj brze, jednostavne i pouzdane voltametrijske tehnike za detekciju prirodnih antioksidansa prisutnih u tkivima biljnog i životinjskog porijekla. Provela se voltametrijska analiza pojedinačnih karotenoida (β -karoten, astaksantin, lutein) i kapsaicina, čime su dobivene informacije o njihovim redoks mehanizmima.

Hipoteza: Testirala se hipoteza da su voltametrijske metode primjenjive za brzu i jednostavnu analizu realnih uzoraka te da navedeni spojevi posjeduju jaki antioksidativni kapacitet.

Svrha: Voltametrijska analiza antioksidativnih spojeva omogućila je bolji uvid u redoks mehanizme te u utjecaj pojedinih strukturnih grupa na elektrokemijska svojstva ispitivanih spojeva. Dobivene informacije pružile su bolje razumijevanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih spojeva.

Opseg rada i metode: Istraživanja su provedena u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi, Zavoda za kemiju materijala na Institutu Ruđer Bošković. Prvi dio istraživanja temeljio se na ispitivanju elektrokemijskih svojstava pojedinačnih karotenoida (β -karoten, astaksantin i dr.) i kapsaicinoida primjenom cikličke (CV) i pravokutnovalne voltametrije (SWV) otopina, odnosno imobiliziranih mikrokristala. Elektrokemijska mjerenja provedena su u širokom rasponu pH-vrijednosti te pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Za mjerenja se koristio troelektrodni elektrokemijski sustav koji se sastojao od radne elektrode, referentne elektrode (Ag/AgCl/3 M KCl) i platinske protuelektrode. Kao radna elektroda, za analizu spojeva u otopinama koristila se elektroda od staklastog ugljika (GCE), dok su se za voltametriju imobiliziranih mikrokristala i imobiliziranog mikofilma koristile parafinom impregnirana grafitna elektroda (PIGE) i minijaturizirana elektroda od grafitne paste (eng. *carbon paste electrode*, CPE). Ove analize dale su informacije o optimalnim eksperimentalnim uvjetima za kvantifikaciju i detekciju analita od interesa u realnim uzorcima.

Druga faza ispitivanja bila je fokusirana na razvoj analitičke metode za kvantifikaciju i/ili detekciju karotenoida, odnosno kapsaicina u realnim uzorcima. Provela se detaljna validacija metode kojom su određeni parametri linearnosti, preciznosti, selektivnosti i osjetljivosti te kako bi se utvrdilo koja od elektroda ima najveći potencijal za primjenu u analitici kapsaicina i karotenoida u realnim uzorcima. Moguća primjena metode za određivanje karotenoida ispitala se na uzorcima potkožnog i mišićnog tkiva riba, dok se kapsaicin određivao u različitim vrstama ljutih paprika.

2. LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji značajno inhibiraju ili odgađaju oksidaciju nekog supstrata iako su prisutni u koncentraciji manjoj od supstrata. To su tvari koje mogu zaštititi stanicu od oštećenja uzrokovanog reaktivnim molekulama, tj. slobodnim radikalima. Oni neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron ili inhibiraju stvaranje slobodnih radikala i na taj način sprječavaju dio mogućih oštećenja koja mogu uzrokovati mnoge bolesti.^{11, 12}

Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona s neke tvari na drugu tvar zvanu oksidans. Oksidacijskim reakcijama mogu nastati slobodni radikali koji onda započinju lančane reakcije kojima dolazi do oštećenja stanica. Antioksidansi zaustavljaju te lančane reakcije uklanjajući slobodne radikale i intermedijere nastale u reakciji slobodnih radikala i biomolekula te inhibirajući ostale oksidacijske reakcije tako što se sami oksidiraju. Antioksidansi koji mogu spriječiti štetno djelovanje slobodnih radikala važni su u obrani organizma od bolesti (ateroskleroze, različitih tipova dijabetesa i sl.).¹³ Voće i povrće bogati su izvori prirodnih antioksidansa (vitamini A, B, C, tokoferoli, kalcij, selen, flavonoidi, fenolne i askorbinske kiseline i sl.), dok životinje održavaju kompleksni sustav različitih vrsta antioksidansa kao što su glutathion, vitamini C i E, kao i enzime poput katalaza, superoksidativne dismutaze i različitih peroksidaza radi očuvanja redoks ravnoteže u organizmu.¹⁴

Oksidativni stres definira neravnoteža između povećane razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i niske aktivnosti antioksidativnog djelovanja. Oksidativni stres može biti glavni razlog nastanka mnogih bolesti, stoga farmaceutska industrija intenzivno proučava upotrebu antioksidansa, osobito u sprječavanju moždanog udara i neurodegenerativnih bolesti. Antioksidansi se također često koriste kao dodatak prehrani za očuvanje zdravlja i sprječavanje bolesti poput karcinoma i srčanih oboljenja.^{1, 2, 16} O važnosti ovih spojeva govori i činjenica da se količina antioksidansa bilježi i na deklaraciji hrane za kućne ljubimce.

Osim upotrebe prirodnih antioksidansa u medicini, ovi spojevi imaju i veliku industrijsku primjenu pa se tako koriste kao konzervansi u hrani i kozmetici te u automobilske industriji za sprječavanje razgradnje gume i benzina. Već dugi niz godina kemičari znaju da slobodni radikali uzrokuju oksidaciju koja se može suzbiti ili spriječiti primjenom

antioksidativnih tvari.³ Na primjer, vrlo je bitno da ulja za podmazivanje ostaju stabilna i da boje i lakovi ne presuše. Iz tog razloga, ulja obično sadrže male količine antioksidansa kao što su fenoli i amini. Iako plastika često nastaje reakcijama slobodnih radikala, ona također može biti razgrađena istim postupkom pa zahtijeva zaštitu pomoću antioksidansa kao što su fenoli ili naftoli.¹³

Većina antioksidansa koja se danas koristi u prehrani, kemijskom strukturom odgovara mono- ili polihidroksilnim fenolima s različitim supstituentima na prstenu. Te tvari imaju nisku aktivacijsku energiju za donaciju vodika. Zbog toga, nastali radikal antioksidansa ne inicira nastanak novog slobodnog radikala jer se energija troši na stabilizaciju delokaliziranog radikalskog elektrona. Propagacija i inicijacija lančanih reakcija slobodnim radikalima može biti odgođena ili svedena na minimum donacijom vodika iz antioksidansa. Nastali spoj, slobodni radikal antioksidansa, je stabilan i ne oksidira brzo. Slobodni radikali antioksidansa mogu reagirati sa slobodnim radikalima oslobođenima iz masti te stvaraju stabilne komplekse i na taj način sprječavaju neka od mogućih oštećenja.^{12, 3}

Mjerenje količine antioksidansa nije brz i jednostavan proces jer je ovo grupa spojeva s različitim aktivnim mjestima koji reagiraju s različitim reaktivnim oksidativnim vrstama. U prehrambenoj i biotehnološkoj znanosti, kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (eng. *oxygen radical absorbance capacity, ORAC*) postao je jedna od standardnih metoda za procjenjivanje jakosti antioksidansa u hrani i aditivima.^{1, 15}

Antioksidansi su pronađeni u različitim količinama u hrani kao što su povrće, voće, orašasti plodovi, cjelovite žitarice, jaja i meso. Priprema i obrada hrane može povećati biodostupnost samih antioksidansa (npr. karotenoida u povrću), no isto tako moguće je i smanjiti udio antioksidansa jer se omogućava reakcija s kisikom. Neki antioksidansi se prirodno nalaze u tijelu. Ubikvinol (koenzim Q10) se loše apsorbira iz crijeva te dolazi u tijelo preko metaboličkog puta. Glutation se stvara iz aminokiselina. Dokazano je da se glutathion u crijevu razlaže na slobodan cistein, glicin i glutaminsku kiselinu prije nego je apsorbiran. No uzimanje velikih doza ovog spoja ne mora nužno utjecati na količinu glutathiona u tijelu. Opskrbljivanje tijela glutathionom iznimno može pomoći prilikom liječenja bolesti kao što su respiratorni problemi. Ostale komponente u prehrani mogu mijenjati razinu antioksidansa na način da se ponašaju kao prooksidansi.^{2, 15}

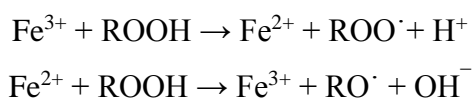
Slobodni radikali su nestabilne, visokoreaktivne molekule s puno energije, koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju nespareni elektron te mogu ili donirati elektron ili ga uzeti

od druge molekule da bi ostvarili stabilnost te se zbog toga mogu ponašati kao oksidansi ili reducensi. Zbog svoje visoke reaktivnosti većinom imaju vrlo kratko vrijeme poluživota (10^{-6} sekunde ili kraće) u biološkim sustavima. Slobodni radikali reagiraju brzo s ostalim spojevima pokušavajući uhvatiti njihove elektrone da bi postigli stabilnost. Kada molekula koja je napadnuta izgubi svoje elektrone, ona i sama postaje slobodni radikal i započinje lančanu reakciju u kojoj nastaju neželjeni spojevi.^{4,16}

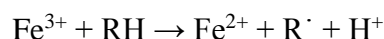
Stvaranje slobodnih radikala u organizmu odvija se putem nekoliko mehanizama na koje utječu endogeni faktori i faktori okoline kao što su onečišćenje zraka, radijacija, pušenje cigareta i herbicidi koji utječu na nastanak neravnoteža između količine tih reaktivnih molekula i štete koju mogu uzrokovati te mehanizama obrane i popravka.⁵

Kemijski gledano, tvar je oksidirana kad je elektron otpušten, a reducirana kad je elektron vezan. Sve redoks reakcije uključuju prijelaz elektrona. Tijelo dobiva energiju tako što postepeno oksidira hranu u kontroliranim uvjetima te ju skladišti u obliku kemijske potencijalne energije zvane ATP (adenozintrifosfat). Tijekom tog procesa, radikali dolazeći iz mitohondrija, i reaktivne oksidativne vrste kao što su superoksid anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^\cdot) te singletni kisik (1O_2), mogu oštetiti određene stanice u tijelu. Ultraljubičasto (UV) svjetlo te onečišćivači zraka čije su količine visoke u smogu, a mi ih možemo udisati, stvaraju isto veliku količinu slobodnih radikala. Također, u hrani bogatoj mastima uz prisutnost željeza (Fe^{3+} , Fe^{2+}) dolazi do stvaranja vodikova peroksida iz kojeg dalje mogu nastati hidroksilni radikali u reakciji koja ovisi o prisutnosti iona željeza.^{3,4,16}

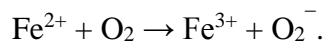
Ubrzana razgradnja vodikova peroksida kojom nastaju peroksilni i alkoksilni radikali prikazana je slijedećom reakcijom:



Alkilni slobodni radikali nastaju direktnom reakcijom s mastima i uljima:



Aktivacija molekula kisika za nastanak singletnog kisika:³



Poznata su i predložena dva reakcijska mehanizma za antioksidanse. Prvi je mehanizam prekida lanca putem kojeg primarni antioksidans donira elektrone slobodnom radikalu prisutnom u sustavu (npr. lipidni radikali). Drugi mehanizam uključuje uklanjanje inicijatora reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species, ROS*) te reaktivnih dušikovih vrsta (eng. *reactive nitrogen species, RNS*) pomoću enzima koji zaustavlja daljnji rast lanca.^{5, 12}

Lančane reakcije slobodnih radikala³

Faza inicijacije

- (1) $\text{RH} \rightarrow \text{R}^\cdot + \text{H}^\cdot$
- (2) $\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\cdot$
- (3) $2 \text{ROOH} \rightarrow \text{ROO}^\cdot + \text{RO}^\cdot + \text{H}_2\text{O}$

Faza propagacije

- (4) $\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\cdot$
- (5) $\text{ROO}^\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\cdot$
- (6) $\text{RO}^\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROH} + \text{R}^\cdot$

Faza terminacije

- (7) $\text{R}^\cdot + \text{R}^\cdot \rightarrow \text{R} - \text{R}$
- (8) $\text{R}^\cdot + \text{ROO}^\cdot \rightarrow \text{ROOR}$
- (9) $\text{ROO}^\cdot + \text{ROO}^\cdot \rightarrow \text{ROOR} + \text{O}_2$
- (10) $\text{Antioksidans} + \text{O}_2 \rightarrow \text{oksidirani antioksidans}.$ ¹⁸

Nadalje, u lančanim reakcijama izazvanima djelovanjem slobodnih radikala kada masti reagiraju s kisikom, nastaju nezasićene masne kiseline koje time povećavaju količinu slobodnih radikala u reakciji (1). Vodikov peroksid koji je prisutan u tragovima prije oksidacije, razlaže se i stvara radikale u reakciji (4). Slobodni radikali oduzimaju vodikov atom nekoj drugoj molekuli te ponovno nastaje vodikov peroksid kojim onda nastaju novi radikali. Ukoliko se u takav sustav dodaju antioksidansi, oni će neutralizirati slobodne radikale tako što će donirati svoje elektrone te će reakcija završiti jednadžbama (7) i (9). Takav proces se uglavnom odvija u tijelu čovjeka.¹⁸ Antioksidansi primjenjivi u prehrani uključuju i tvari koje održavaju da jestiva mast i ulja ne postaju užegli te da voće i povrće ne istrune prebrzo. Neki od primjera su sintetski antioksidansi butilni hidroksilanol (BHA) i butilni hidroksitoluen (BHT) te prirodni antioksidansi askorbinska kiselina (vitamin C) i α -tokoferol (vitamin E). Aromatski prsten u

strukturi vitamina reagira i uklanja najreaktivnije vrste kisikovih radikala te štiti nezasićene masne kiseline od oksidacije i sprječava oksidativna oštećenja same membrane.

2.1.1. Klasifikacija antioksidansa

Antioksidansi se s obzirom na porijeklo mogu podijeliti u dvije grupe:¹⁶

1. Primarni ili prirodni antioksidansi
2. Sekundarni ili sintetski antioksidansi

Prirodni antioksidansi reagiraju sa lipidnim radikalima i prevode ih u stabilnije produkte. Mogu biti antioksidansi velike i male molekulske mase, s različitim strukturama, kemijskim i fizikalnim svojstvima, posjedovati razlike u mehanizmu i mjestu djelovanja. Antioksidansi ove skupine imaju uglavnom fenolnu strukturu i uključuju slijedeće vrste:^{4, 17, 20}

1. *Antioksidativni minerali*
2. *Antioksidativni vitamini*
3. *Fitokemikalije*
4. *Enzimi*
5. *Antioksidansi male molekulske mase*
 - i) antioksidansi topljivi u mastima (tokoferoli, karotenoidi, kvinoni, bilirubin i drugi fenoli)
 - ii) antioksidansi topljivi u vodi (askorbinska kiselina, mokraćna kiselina i polifenoli)

Sekundarni ili sintetski antioksidansi su fenolne tvari koje se vežu za slobodne radikale i zaustavljaju lančanu reakciju. Oni uključuju:^{5, 17}

1. *Butil - hidroksianisol (BHA)*
2. *Butil - hidroksitoluen (BHT)*
3. *Propil galat (PG) i metalni kelati (EDTA)*
4. *Terc - butil hidrokinon (TBHQ)*
5. *Nordihidrogvajaretinska kiselina (NDGA)*

Antioksidansi se još mogu podijeliti i prema mehanizmu djelovanja u organizmu (preventivni antioksidansi, enzimski antioksidansi te «hvatači» slobodnih radikala (eng. *scavengers*)).¹⁹

Jedan od glavnih interesa prehrambene industrije za antioksidanse je njihova mogućnost sprječavanja nepoželjnih mirisa, užeglosti proizvoda i sličnih pojava. Ove nepoželjne karakteristike povezane su uz proces lipidne peroksidacije, neenzimske ili peroksidacije inicirane enzimom lipoksigenazom u biljkama. Zbog toga, znanstvenici prehrambene industrije često nadopunjuju antioksidanse s inhibitorima lipidne peroksidacije i posljedično sprječavaju propadanje hrane. Nasuprot tome, u čovjekovom gastrointestinalnom traktu, kao i u tjelesnim tkivima, oksidativno oštećenje proteina ili deoksiribonukleinske kiseline (DNK) je jednako važno, ako ne i važnije od oštećenja lipida. Oksidativno oštećenje DNK može biti riskantan faktor za razvoj karcinoma, pa se očekuje da će prehrambeni antioksidansi posjedovati mogućnost antikarcinogenog učinka *in vivo*. Zbog toga se primjenjuje šira definicija antioksidansa koja kaže da je to bilo koja tvar koja, kad je prisutna u maloj koncentraciji u usporedbi sa oksidirajućim supstratom, značajno odgađa ili sprječava oksidaciju tog supstrata. Pojam "oksidirajući supstrat" obuhvaća gotovo sve (osim vode, H₂O) što se nalazi u hrani i živim tkivima te uključuje proteine, lipide, ugljikohidrate i DNK.¹

2.2. Kapsaicinoidi

2.2.1. Osnovne značajke

Izraz kapsaicinoidi odnosi se na skupinu spojeva koji se u velikoj količini nalaze u čili paprikama, a najzastupljeniji su u tipovima *Capsicum annum* i *Capsicum frutescens*. Ovi spojevi zaslužni su za karakterističan osjet ljutine čili paprika i proizvoda koji sadrže ekstrakt ljute paprike ili čiste komponente.^{21, 22} Kapsaicin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid) je najzastupljeniji kapsaicinoid te su farmakološka svojstva ostalih spojeva ove skupine određena prema njemu.⁵ Kemijski gledano, kapsaicin je fenolna komponenta topiva u mastima.²² Poznat je pod raznim sinonimima, npr. N-[(4-hidroksi-3-metoksibenzil)-8-metil-trans-6-nonenamid, N-[(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)metil]-8-metil-trans-6-nonenamid, N-(3-metoksi-4-hidroksibenzil)-8-metilnon-trans-6-enamid, trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamid i 8-metilnon-6-enoil-4-hidroksi-3-metoksibenzilamid. Kapsaicin je spoj bez mirisa, bijeli

kristalni prah molekulske mase od $305,4118 \text{ g mol}^{-1}$, točke taljenja 65°C , točke vrelišta pri $0,01 \text{ mm Hg}$ od $210\text{--}220^\circ\text{C}$, sublimira pri 115°C , a maksimalna valna duljina je $227,281 \text{ nm}$. Netopljiv je u vodi, slabo je topljiv u ugljikovom disulfidu i vrućoj vodi, dok se otapa u alkoholu, eteru, benzenu i kloroformu. Relativno je otporan na kiseline i lužine pri sobnoj temperaturi.²³

Struktura kapsaicina prikazana je na slici 2.1. (A), a prvi ga je izolirao znanstvenik Christian Friedrich Bucholz (1770. – 1818.) iz biljke *Capsicum* (*Solanaceae*)⁵, dok su molekulsku strukturu kapsaicina prvi prikazali Nelson i Dawson 1919. godine.²⁴ S obzirom da dvostruka veza sprječava unutarnju rotaciju, kapsaicin pokazuje *cis/trans* izomerizam. Najčešće je u *trans* izomerskoj formi jer su u *cis* formi propilna grupa ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) i dugi lanac na drugoj strani dvostruke veze jako blizu što dovodi do steričkih smetnji zbog slabog odbijanja između njih.²⁵

Odnos strukture i različitih aktivnosti (eng. *structure activity relationship, SAR*) može se objasniti podjelom molekula kapsaicina u tri dijela: aromatski dio, amidnu vezu i hidrofobni sporedni lanac. Za dobru aktivnost neophodni su supstituenti na pozicijama 3 i 4 u aromatskom prstenu, a fenolna 4-OH skupina u analogu kapsaicina je od osobite važnosti, dok je H-veza donorsko/akceptorskih svojstva fenolne skupine važna za agonističku aktivnost.²⁶ Hidrofobni bočni lanac, npr. oktilni lanac i supstituirani benzil ili neka druga skupina, potrebni su za visoku aktivnost. Najoptimalnije je da se takve arilne skupine zamjene u para položaju s malim hidrofobnim grupama.²⁷ Također je istraženo da su duljine lateralnog lanca važne za bioaktivnost kapsaicinoida.²⁸

U biljkama postoji veliki broj prirodno prisutnih kapsaicinoida^{29–31}, no kapsaicin je najzastupljeniji s oko $\sim 60\text{--}90 \%$ ukupnih kapsaicinoida u čili paprici ili u njezinu ekstraktu.³³ Najčešće istraživani kapsaicinoidi su kapsaicin i dihidrokapsaicin. Dihidrokapsaicin (8-metil-N-vanililnonanamid) je zasićeni analog kapsaicina (slika 2.1. B). Nonivamid (N-vanililnonanamid, PAVA, kapsaicin II, N-Van itd.), koji ima nerazgranati i zasićeni alkilni lanac sastavljen od 9 ugljikovih atoma (slika 2.1. C), često se koristi kao zamjena za kapsaicin, dihidrokapsaicin ili ekstrakt iz čili paprika u farmaceutskoj industriji i komercijalno dostupnim proizvodima. Nonivamid je lako i ekonomski isplativo sintetizirati u većim količinama te je dostupan u visoko pročišćenom obliku.⁵

Plodovi roda *Capsicum* (ljute čili paprike) najčešće su korišteni začini.³⁴ Kapsaicin originalno potječe iz Bolivije i dijela Brazila te je prisutan posljednjih 7000 godina.^{36, 37} Čili

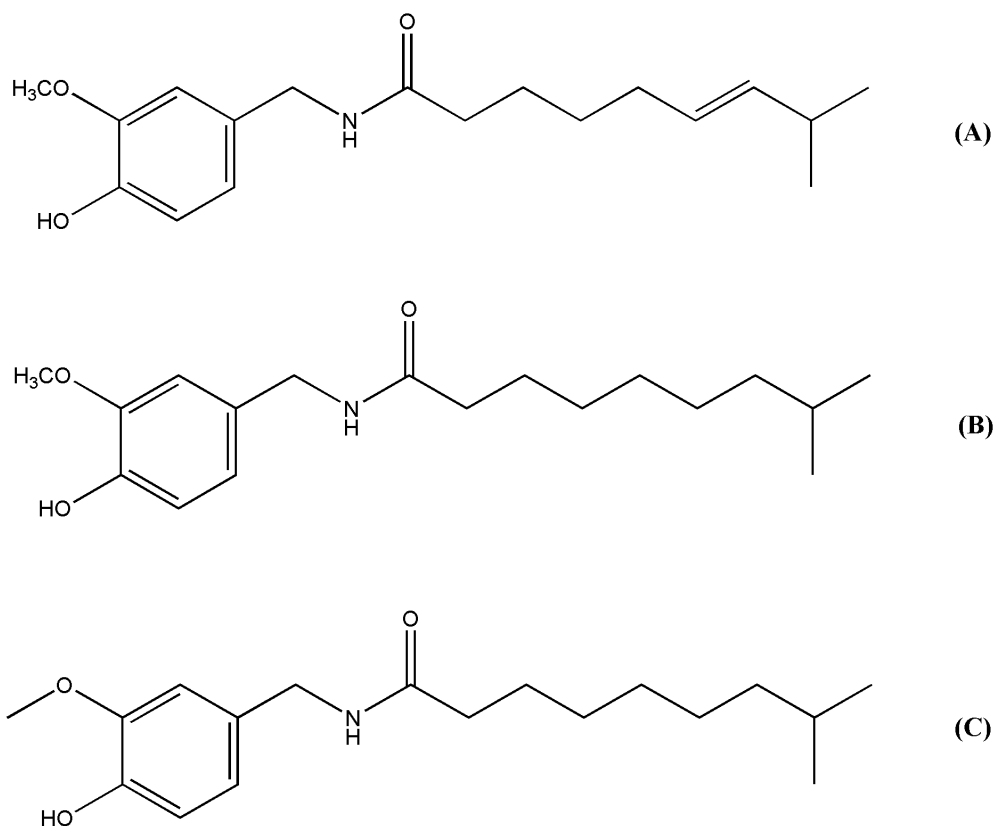
paprike su uglavnom konzumirane kao dodaci hrani u mnogim dijelovima svijeta zbog njihove specifične ljutine, arome i boje.³⁷ Jedna četvrtina svjetskog stanovništva svakodnevno konzumira čili paprike.³⁸ Kapsaicin, koji je ujedno i najveći alkaloid od svih kapsaicinoida, nastaje u samoj biljci *Capsicum*.³⁹ Rod *Capsicum* sadrži oko 200 vrsta, a klasificiraju se, s obzirom na ljutinu, prema Scovillovim jedinicama ljutine (SHU) kao što je prikazano u tablici 4.1. Što je paprika ljuća, to je viša njezina SHU vrijednost. Najveća koncentracija kapsaicina pronađena je u rasplodnom dijelu biljke, a najmanja u sjemenkama.⁴⁰ Sjemenke nisu izvor ljutine, no često apsorbiraju kapsaicin jer su u blizini posteljice ploda biljke. Većina, oko 89%, kapsaicina smještena je u placenti biljke, a oko 5-6% u omotaču sjemenke (perikarpu) i sjemenkama.^{42, 43} Sastav kapsaicina može varirati kod različitih sorta iste vrste i plodova jedne sorte. Na ljutinu utječu vremenski uvjeti kao što je toplinski val i manjak vode, a ljutina se povećava sa zrelošću ploda.⁴³

Vrsta *Capsicum* dio je porodice *Solanaceae*, porodica biljaka dvosupnica. To je velika, gospodarski važna porodica biljaka koja također uključuje patlidžan, petuniju, krumpir, duhan i rajčicu. Sve vrste roda *Capsicum* potječu sa zapadne hemisfere i izvorno su nađene u tropskim područjima Sjeverne i Južne Amerike. Na autohtonim staništima, čili paprike su višegodišnji grmovi, dok se u hladnijim klimama uzgajaju i kao godišnje (sezonske) biljke. Biljke čili paprika variraju u izgledu i veličini te iako neke čili paprike rastu do 10 metra u visinu, prosječna visina kultiviranih biljaka manja je od 1 metra. Većina kultiviranih biljaka čili paprika se samooprašuje, što znači da nije potrebna druga biljka da bi nastao plod. Vrste roda *Capsicum* imaju puno oblika, boja i veličina. Nezreli plodovi su zeleni, žuti, bijeli ili ljubičasti, dok zreli plodovi mogu biti crvene, narančaste, smeđe, žute, zelene ili bijele boje. Većina je sorti spremna za berbu dok su još u zelenoj fazi nakon otprilike 70 dana, a potpuno sazrijevaju nakon 130 dana. Kada se beru u zelenoj fazi, cvjetovi se smatraju povrćem, a kada se beru suhi sa zrelim bojama, smatraju se začinima.⁴⁴

Kapsaicinoidi imaju različite učinke kod ljudi i životinja, a jedan od glavnih je osjet jakog peckanja, suzenja, kašljanja i kihanja, kao i crvenilo na mjestima kontakta. Također uzrokuju jaku iritaciju koja se opisuje peckanjem i/ili svrbežom te lokaliziranom upalom tkiva i nastankom eritema.⁴⁵ Nakon intenzivne boli uzrokovane kapsaicinoidima, pojavljuju se i privremeni i reverzibilni gubitak senzorske neuronske osjetljivosti na mnoge podražaje što je osnova za korištenje kapsaicinoida u liječenju kroničnih bolova.^{46, 47} Kapsaicinoidi posebno izazivaju iritaciju očiju, kože, sluznice nosa, jezika te respiratornog sustava gdje receptor

kapsaicina (odnosno, vaniloid receptor-1/VR1 ili eng. *transient receptor potential vanilloid-1/TRPV1*) završava.^{45–47} Aktivacija TRPV1 na ovim neuronima inicira potencijale koji aktiviraju zaštitne refleksne odgovore kao što je povlačenje iz stimulansa koji uzrokuje bol, kašlja i bronhokonstrikcije.

Ljudi su kapsaicinoidima najčešće izloženi kroz prehranu. Značajna izloženost kapsaicinoidima također se može pojaviti kroz upotrebu istih kao dodataka prehrani koji se upotrebljavaju kao lijekovi za regulaciju probave i/ili gubitak težine, lokalne kreme (npr. Capzasin-HP) i injekcijske formulacije (Adlea / ALGRX-4975), a često se koriste za liječenje kronične boli. Određeni pojedinci mogu također biti izloženi aerosoliziranim kapsaicinoidima zbog udisanja para prilikom kuhanja ili preko sprejeva za samoobranu.^{33, 49–54} Znanstveno povjerenstvo Europske Komisije o hrani, 2002.⁵⁴ i drugi izvori⁵⁵ pokazali su da prehrambeni unos kapsaicina kod ljudi može dosegnuti od 0,5 do 4 mg/kg/dan. Prirodni izvori kapsaicinoida su klasificirani kao GRAS (eng. *Generally Regarded As Safe*) tvari.⁵⁴ Prirodni kapsaicinoidi su odobreni kao aditivi za hranu i lokalne analgetike, koji pokazuju najnižu razinu toksičnosti za sve putove izloženosti.^{57, 58}



Slika 2.1. Strukturne formule kapsaicina (A), dihidrokapsaicina (B) i nonivamida (C).

Kapsaicinoidi se često koriste u raznim proizvodima, nutraceutskim i farmaceutskim pripravcima, uključujući sprej za samoobranu, dodatke prehrani za gubitak tjelesne mase, terapijke za kontrolu boli te kao antioksidansi, odnosno kemopreventivne supstance. U ljudskom tijelu se kapsaicinoidi brzo razgrađuju i/ili modificiraju pomoću brojnih enzimskih procesa koji značajno mijenjaju farmakološka i toksikološka svojstva kapsaicinoida.⁵

2.2.2. Svojstva

Osim što je poznato korištenje kapsaicina kao dodatka hrani u zemljama južne Azije i Latinske Amerike, koristi se i u zdravstvene svrhe jer smanjuje bol i upalne procese povezane s različitim bolestima uključujući reumatski artritis, dijabetičku neuropatiju, kronične glavobolje, *herpes zoster* itd. Novije studije ukazuju i na njegovo antikarcinogeno djelovanje kod karcinoma gušterače, prostate, debelog crijeva i melanoma.⁵ U slijedećim odlomcima ukratko su opisane najznačajnije karakteristike kapsaicina koje uključuju:

1. Farmakološko djelovanje
2. Ublažavanje boli
3. Sprječavanje nastanka karcinoma
4. Gubitak tjelesne mase
5. Učinak na kardiovaskularni sustav
6. Gastrointestinalno djelovanje
7. Toksikološko djelovanje

1. Farmakološko djelovanje

Kapsaicin se učinkovito apsorbira i postiže maksimalnu koncentraciju kod lokalne primjene. Vrijeme poluraspada kapsaicina, odnosno njegova stabilnost je 24 sata.⁵⁸ Istraživanjima je pronađeno da oralno primijenjen kapsaicin apsorbira i postiže maksimalnu koncentraciju u krvi već nakon 1 sata od primjene, a zatim koncentracija pada te ga se nakon 4 dana više ne može detektirati.⁵⁹ *In vitro* studije na ljudskoj koži pokazale su da kapsaicin većinom ostaje nepromijenjen, dok se samo mali dio metabolizira u vanililamin i vanililnu kiselinu što dalje objašnjava ulogu enzima citokroma P450 u transformaciji kapsaicina u ljudskoj koži.^{60, 61}

Kapsaicin djeluje na način da se veže za prijelazni receptor vaniloid 1 (TRPV1), koji je poznat kao vaniloidni receptor, a uglavnom je izražen u osjetilnim neuronima.⁶¹ Neselektivan je u prirodi i omogućuje vezanje kationskih liganada. TRPV1 je također rasprostranjen u tkivu mozga, mokraćnog mjehura, bubrega, crijeva, karatinocita epiderma, glija stanica, jetre i polimorfonuklearnih granulocita, mastocita i makrofaga.^{62, 63} TRPV1 sadrži 838 aminokiselina i ima molekulsku masu od 95 kDa u tijelu čovjeka te se sastoji od 6 transmembranskih domena.⁴⁵ Endogene tvari kao što su endovaniloidi, mogu regulirati i aktivirati kationski kanal koji je propustan za ione natrija i kalcija, a različiti egzogeni stimulansi koji uključuju kemijske tvari kao što su kapsaicin, olvanil i reiniferatoksin (analog kapsaicina) i ligandi koji su vrlo lipofilni identificirani su kao TRPV1 agonisti.⁶³ Podjedinica TRPV1 osjetljiva na ljutinu odgovorna je za osjet gorenja koji uzrokuje kapsaicin. Kad se kapsaicin veže za TRPV1, dolazi do porasta intracelularnog kalcija koji omogućuje otpuštanje neuropeptida kao što je supstanca P i peptida koji je genski vezan s kalcitoninom (eng. *calcitonin gene-related peptide*, *CGRP*). Vezanje između kapsaicina i senzorskih neurona proizvodi bol, upalu i lokalno dolazi do osjeta ljutine.²³

2. Ublažavanje boli

Kod lokalne primjene kapsaicina, smanjuje se osjetljivost u kožnim senzorskim neuronima zbog trošenja supstance P i dolazi do analgetskog djelovanja.⁶⁴ Kapsaicin pomaže u smanjenju upalnih procesa i štetnih kemijskih hiperalgezija i boli kao posljedica reumatoidnog artritisa ili fibromijalgije.⁶⁵ Kapsaicin je također ključni sastojak u lijeku „Adlea“, lijeku koji je u drugoj fazi kliničkih istraživanja kao dugotrajni analgetik za liječenje post-kirurške boli i boli kod osteoartritisa.⁶⁶

3. Sprječavanje nastanka karcinoma

Antikarcinogena aktivnost kapsaicina se već dugo istražuje. U uzgojenim stanicama, kapsaicin je bio u mogućnosti blokirati migraciju stanica karcinoma dojke i inhibirati rast stanice karcinoma prostate, a dihidrokapsaicin je inducirao autofagiju u karcinomskim stanicama debelog crijeva kod čovjeka.^{67–69} Prirodni kapsaicin također pokazuje inhibiciju rasta stanica leukemije.⁷⁰ Stanična proliferacija ima glavnu ulogu u višestupanjskoj karcinogenezi i

predstavlja kritičan znak za prevenciju nastanka karcinoma. Kapsaicin selektivno inhibira rast ili izaziva apoptozu malignih staničnih linija, ali ne i normalnih staničnih linija. Međutim, istraživanja su također pokazala da metaboliti kapsaicina (kao što su reaktivni fenoksi radikali) mogu djelovati na DNK i potaknuti mutagenost i malignu transformaciju.⁷¹

4. Gubitak tjelesne mase

Kako pretilost predstavlja veliku prijetnju ljudskom zdravlju, razne strategije za gubitak težine i održavanje tjelesne težine dobivaju veliku pozornost širom svijeta. Budući da metabolizam zajedno s termogenezom ima važnu ulogu u regulaciji pretilosti, čili paprike se smatraju načinom koji bi mogao imati potencijalna pozitivna svojstva u borbi protiv iste.^{72–74} Kapsaicin povećava potrošnju energije i smanjuje akumulaciju masti u pokusima na životinjama kao i kliničkim ispitivanjima.^{75, 76} Molekulski mehanizmi odgovorni za učinak kapsaicina protiv pretilosti pokazali su da su termogeneza i proteini povezani s metabolizmom lipida značajno promijenjeni nakon djelovanja kapsaicinom, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u regulaciji metabolizma. Iako kapsaicin ima pozitivno djelovanje protiv pretilosti, potencijalne nuspojave ograničavaju njegovu primjenu u praksi.⁷³ CH-19 slatka paprika (glavni izvor prirodnih kapsaicinoida), pokazala se kao pozitivna opcija za gubitak tjelesne težine. Utvrđeno je da bi jedna doza CH-19 paprike mogla povećati tjelesnu temperaturu i potrošnju kisika, dok bi ponovljeni unos slatke paprike mogao smanjiti tjelesnu težinu i potaknuti oksidaciju masnoća.⁷⁵

5. Učinak na kardiovaskularni sustav

Postoje dokazi da kapsaicinoidi imaju potencijalno pozitivne učinke za liječenje različitih kardiovaskularnih bolesti kod ljudi koje uključuju koronarne bolesti srca, infarkt miokarda, hipertenziju i aterosklerozu.^{78, 79} Kardiovaskularni sustav sadrži živce osjetljive na kapsaicin, koji imaju veliku ulogu u regulaciji kardiovaskularnih funkcija kroz oslobađanje višestrukih neurotransmitera kao što je kalcitonin (CGRP) kroz aktivaciju TRPV i supstance P.^{79, 80} Kapsaicin inhibira agregaciju trombocita i aktivnost čimbenika zgrušavanja VIII i IX, svojstvo koje smanjuje mogućnost nastanka kardiovaskularnih bolesti. Predloženo je da kapsaicin može proći kroz plazmatsku membranu trombocita i promijeniti fluidnu membranu.^{81, 82} U prilog tome idu i nedavne studije koje su pokazale prisutnost TRPV1 u ljudskim trombocitima.⁸²

Kapsaicin inducira otpuštanje Ca^{2+} iz intracelularnih skladišta trombocita i nakon toga pridonosi aktivaciji trombocita izazvanom adenzindifosfatom (ADP) i trombinom. Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL) dovodi do razvoja i napredovanja ateroskleroze. *In vitro* istraživanjima pokazano je da je kapsaicin u mogućnosti povećati otpornost LDL na oksidaciju odgađanjem inicijacije oksidacije i/ili usporavanjem brzine oksidacije. Redovita konzumacija čili paprika tijekom četiri tjedna otkrila je da se povećava otpornost serumskih lipoproteina na oksidaciju kod odraslih muškaraca i žena.⁸³ To pokazuje da zbog antioksidativnih svojstva kapsaicinoida i oni djeluju kao potencijalne kliničke komponente za prevenciju kardiovaskularnih bolesti, kao što su ateroskleroza i koronarna srčana bolest.

6. Gastrointestinalno djelovanje

Osjetilni živci osjetljivi na kapsaicin također su prisutni u gastrointestinalnom sustavu koji ima ključnu ulogu u održavanju integriteta gastrointestinalne sluznice protiv štetnih djelovanja. Kapsaicinoidi pokazuju korisne ili štetne učinke na gastrointestinalnu sluznicu ovisno o dozi i/ili trajanju liječenja. Visoka doza kapsaicinoida obično dovodi do ispuštanja neurotransmitera i oštećenja osjetljivih živaca osjetljivih na kapsaicin, što može imati štetne učinke na gastrointestinalni sustav.^{79, 85} Međutim, niska doza kapsaicinoida može povećati bazalni želučani mukozni protok krvi i izlučivanje želučane sluzi te olakšati uspostavljanje novog želučanog epitela, što je korisno za gastrointestinalnu obranu.⁸⁵

7. Toksikološko djelovanje

Zabilježeno je da kapsaicin nakon oralne primjene uzrokuje histopatološke i biokemijske promjene, uključujući eroziju želučane sluznice te lezije na jetri i bubrezima. Eksperimenti o subkroničnoj i kroničnoj toksičnosti oralno primijenjenih preparata potvrđuju lokalni iritativni učinak kapsaicina. Ispitivana je i karcinogenost kapsaicina i utvrđeno je da nije pokazivao karcinogenost kod miševa u dozi do 375 mg kapsaicinoida/kg tjelesne težine/dan. U istraživanjima kod ljudi, povećani unos čili paprika u Meksiku s dnevnim unosom od 200 mg kapsaicinoida/osobi pokazao je povećan rizik od karcinoma želuca. Na temelju grube pretpostavke niske toksičnosti za oralne doze od 4 mg kapsaicinoida/ kg tjelesne težine kod ljudi i upotrebom sigurnosnog faktora od 20, teoretski maksimalni dnevni unos (eng. *theoretical*

maximum daily intake, TMDI) izražen za ukupne kapsaicinoide postavljen je na 0,2 mg/kg tjelesne težine.⁸⁶

Kapsaicin je široko istraživana i važna molekula u području medicine, no njegova klinička primjena još uvijek je vrlo ograničena zbog niske selektivnosti i relativno visoke toksičnosti. Nadalje, ljutina također ograničava njegovu upotrebu u kliničkim ispitivanjima. Međutim, kapsaicin je obećavajuća molekula ako se naprave neke modifikacije u kemijskoj strukturi kako bi se prevladala njegova nepoželjna svojstva. Različite analogne molekule razvijene su kao odgovor kapsaicinu. Stoga su i sve daljnje studije ostale usredotočene na iskorištavanje ove molekule za razvoj ljekovitih sredstva.²³

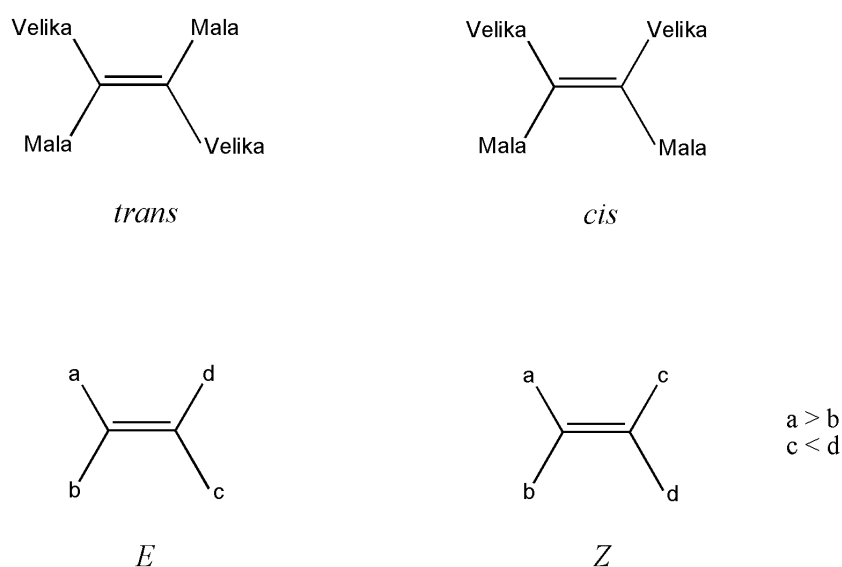
2.3. Karotenoidi

2.3.1. Osnovne značajke

Karotenoidi su prirodni pigmenti žute, narančaste ili crvene boje. Privukli su pažnju zbog velike zastupljenosti, strukturne raznolikosti i različitih funkcija i djelovanja. Procjenjuje se da se oko 100 milijuna tona ovih spojeva godišnje proizvodi u prirodi. Danas je poznato da u prirodi postoji oko 800 prirodno prisutnih karotenoida, od kojih je između 520 i 550 potpuno okarakterizirano.⁸⁷ Semisistematsku nomenklaturu karotenoida koja pruža informacije o strukturi, uključujući stereokemiju (trodimenzionalnu strukturu), izradile su dvije internacionalne udruge za kemiju, International Union of Pure and Applied Chemistry te International Union of Biochemistry. Nazivi se temelje na nazivu korijena riječi "karoten", kojoj prethode grčki prefiksi (α , β , ϵ , ψ , κ , γ , ζ), što označava dvije krajnje skupine, zajedno s brojevima za ugljikove atome. Promjene u hidrogenaciji i prisutnost supstituenata koji sadrže kisik označeni su standardnim prefiksima i sufiksima koji se koriste u organskoj kemiji. Apsolutna stereokemija kiralnih, optički aktivnih karotenoida označena je oznakom *R/S*. Karotenoidi imaju jednostavna imena, obično izvedena iz bioloških izvora iz kojih su prvi izolirani. Danas je poželjna oznaka *E/Z* za označavanje konfiguracije dvostrukih veza, umjesto još uvijek često korištene *cis/trans* terminologije. Dva alternativna sistema nomenklature prikazana su na slici 2.2.⁸⁸

Karotenoidi nemaju jednostavnu, ravnu dvodimenzionalnu strukturu, već imaju precizan trodimenzionalni oblik koji je važan za određivanje njihovih funkcija. Nekoliko

različitih stereokemijskih faktora doprinosi obliku molekule.⁸⁷ Osnovna molekulska struktura većine karotenoida sastoji se od poliizoprenoidnog C40 ugljikovog lanca s nizom konjugiranih dvostrukih veza smještenih u središnjem dijelu molekule. Ova prepoznatljiva značajka omogućava učinkovitu delokalizaciju elektrona duž cijele duljine polienskog lanca te omogućuje karotenoidima ne samo njihov specifičan molekularni oblik, već i pigmentaciju, mogućnost lakog sakupljanja svjetlosti tijekom fotosinteze te kemijsku aktivnost. Ukupna molekulska geometrija (veličina, oblik, prisutnost funkcionalnih skupina) mora osigurati uklapanje karotenoida u stanične i subcelularne strukture na ispravan položaj i u pravilnoj orijentaciji, kako bi mogli učinkovito funkcionirati. Karotenoidi bez cikličkih struktura, kao što je likopen, dugačke su, linearne molekule, dok je β -karoten diciklički polien s β -iononskim prstenima na oba kraja molekule. Ciklizacija skraćuje ukupnu duljinu molekule i povećava ukupnu djelotvornu masu krajnjih skupina i prostor koji zauzimaju. Likopen i β -karoten su također primjeri karotenoida koji imaju unutarnju molekularnu simetriju u kojoj je polovica molekule jednaka drugoj polovici. Tako centralno cijepanje β -karotena ima potencijal za nastanak dvije molekule retinola, što svrstava β -karoten u jedan od najjačih provitamina A.⁸⁹



Slika 2.2. Prikaz dva alternativna sistema nomenklature u terminologiji karotenoida.⁸⁸

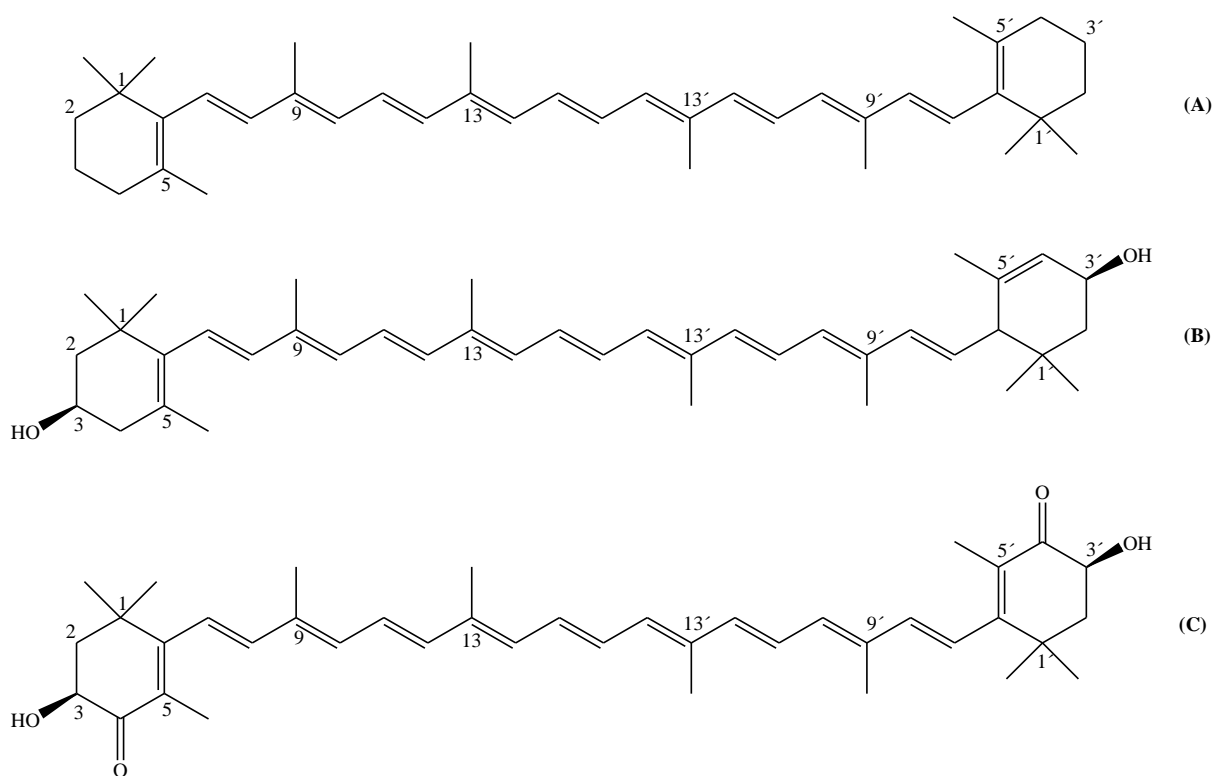
Svaki karotenoid može postojati u obliku puno geometrijskih (*cis/trans* ili *E/Z*) izomerskih formi, odnosno različit je položaj supstituenata oko ravne dvostruke veze ugljik-ugljik. Veličina i oblik *Z*- i *E*- izomera bitno su različiti, što utječe na njihova svojstva i biološke aktivnosti i funkcije. *E*-izomeri su linearne i krute molekule, dok su *Z*-izomeri fleksibilni, stoga se njihova

sposobnost da se poslože u supramolekularnoj strukturi, uklope u subcelularne strukture i dođu u interakciju s enzimima, razlikuje. Sklonost *Z*-izomera da kristaliziraju ili agregiraju obično je mnogo manja pa imaju nižu točku taljenja i mogu se lakše otopiti i apsorbirati te nisu vezani za specifično mjesto za razliku od *E*-izomera.^{90, 91} Za karotenoide, *E* (njem. *entgegen*) u većini slučajeva odgovara *trans*, a *Z* (njem. *zusammen*) *cis* izomerima, osim kod karotenoida s kisikovim supstituentima u polienskom lancu te za egzocikličke dvostruke veze. Pojam "stereokemijski set" koristi se za sve *E/Z* izomere karotenoida.⁹¹ Za likopen, sa simetričnim kromoforom ($n = 11$), postoji 1056 mogućih geometrijskih izomera. Međutim, broj *Z* izomera koji se mogu izolirati je uvijek znatno niži i ovisi o relativnoj stabilnosti izomera te korištenim tehnikama razdvajanja. Za razliku od većine karotenoida s različitom apsolutnom stereokemijom (kiralnost), geometrijski izomeri mogu se interkonvertirati u organskim otapalima. Taj se proces naziva izomerizacija ili stereomutacija, a također se može provesti i kod karotenoida koji u strukturi imaju diene pod određenim uvjetima.⁹² (13*Z*) β , β -karoten koji je kinetički najstabilniji, detektiran je u serumu pacijenata koji pate od eritropoetske porfirije, nakon ubrizgavanja sa sintetičkim β , β -karotenom.⁹³ Prilikom dodatka prehrani *E/Z* smjesa (*E*:9*Z*:13*Z* u omjeru 75:3:22) astaksantina, ispitivane vrste riba (*Salmo salar* i *Salvelinus alpinus*) selektivno su nakupljale *E*-aksaksantin u plazmi i mišićima te 13*Z*-aksaksantin u jetri⁹⁴, za razliku od rezultata s humanim serumom.⁹⁵

Karotenoidi su vrlo lipofilni, odnosno netopljivi su u vodi, a topljivi su u organskim otapalima kao što su aceton, alkohol, etil eter, kloroform i etil acetat u različitim količinama. Karoteni su lako topivi u petroleteru, heksanu i toluenu, dok se ksantofili bolje otapaju u metanolu i etanolu. Kristalne karotenoide teško se može otopiti u gore navedenim otapalima, ali se otapaju u benzenu i diklormetanu. I β -karoten i ksantofil lutein imaju izvrsnu topljivost u tetrahidrofuranu.⁹⁶ U stanicama, karotenoidi se zadržavaju u hidrofobnim područjima kao što je unutarnji dio membrane, no povezanost s proteinom omogućuje im pristup hidrofilnom okolišu.⁸⁹

2.3.2. Podjela karotenoida

Likopen, β -karoten i α -karoten pripadaju grupi karotenoida poznatih kao karoteni. Karotenoidi kao što su β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin imaju oksigenirane krajnje skupine i klasificirani su kao ksantofili. Prvotna molekula karotenoida može se dalje modificirati promjenama u strukturi dvostruke veze i dodavanjem oksigeniranih krajnjih skupina. Apokarotenoidi i norkarotenoidi su primjeri karotenoida koji su izgubili ugljikove atome s krajeva ili unutar polienskog lanca, bilo oksidativnim ili biološkim cijepanjem. Hidroksilirani karotenoidi često su prisutni u prirodi kao glikozidi ili su esterificirani na dugolančane masne kiseline što ih čini hidrofobnijima.⁸⁸



Slika 2.3. Kemijska struktura tri karotenoida: β -karotena (A), luteina (B) i astaksantina (C).

Karoteni

Karoteni su tipični karotenoidi relativno jednostavne strukture ugljikovodika te ne sadrže atome kisika. Daju specifično svjetlo-narančasto obojenje. Likopen i ζ -karoten su od spomenutih acikličkih karotena najčešći. Likopen se ne susreće tako često kao ζ -karoten, ali ukoliko se nalazi u voću i povrću, obično je dominantan pigment. Primjeri izvora likopena u hranjivim tvarima su rajčica, lubenica, papaja, guava, grejpfrut i trešnja.⁹⁷ ζ -Karoten je jako raširena vrsta karotena, no obično je prisutan u niskim koncentracijama, osim u brazilskom voću, marakuji i karamboli, u kojima se pojavljuje kao glavni pigment. Fitoen i fitofluen su vjerojatno više zastupljeni, nego što je objavljeno. S obzirom da su oboje bezbojni, njihova prisutnost se često može previdjeti. Biciklički β -karoten (Slika 2.3. A) je najrašireniji od svih karotenoida prisutnih u hrani te se nalazi u gotovo svoj analiziranoj hrani kao manje ili više zastupljeni pigment.⁹⁷ β -karoten je najzastupljeniji karotenoid u aceroli, marelici, mrkvi, lokvatu, dinji i batatu. Biciklički α -karoten i monociklički γ -karoten ponekad su prisutni uz β -karoten, obično pri mnogo manjim koncentracijama. Značajne količine α -karotena nalaze se u mrkvi, crvenom palminom ulju i nekim vrstama tikve i bundeve.⁸⁸

Ksantofili

Ovi spojevi sadrže jedan ili više kisikovih atoma i funkcionalne skupine kao što su hidroksi, epoksi, keto, karboksi i metoksi. U hrani se nalaze u velikom broju te su odgovorni za žuto i tamnocrveno obojenje. Rubiksantin, derivat γ -karotena, glavni je pigment u šipku⁹⁸, a pojavljuje se i u značajnoj količini u trešnji. β -kriptoksantin je glavni pigment kod puno voća narančaste boje poput breskve, nektarine, naranče, papaje, kakija i rajčice.⁹⁷ Često se pojavljuje i kao sekundarni pigment. Lutein (dihidroksilni derivat α -karotena) je prisutan u biljnim tkivima u znatno većoj količini nego zeaksantin (dihidroksi derivat β -karotena), a kemijska struktura ovog spoja prikazana je na slici 2.3. (B). Lutein je dominantan karotenoid u žutim jestivim cvjetovima, zelenom lišću i drugom zelenom povrću.⁹⁷ Zeaksantin je inače manje prisutan karotenoid, međutim glavni je pigment u žutom kukuruzu, brazilskom plodu *Cariocar villosium* i istočnom azijskom gojiu (*Lycium barbarium*)⁹⁹. Karotenoli u zelenim listovima¹⁰⁰ i kukuruzu nisu esterificirani^{102, 103}, dok su karotenoli u voću uglavnom esterificirani masnim kiselinama.

Epoksikarotenoidi čine veliku skupinu ksantofila u hrani. Derivati zeaksantin epoksida, anteraksantin, mutatoksantin, violaksantin, luteoksantin, auroksantin i neoksantin često su prisutni ksantofili. Također dokazano je postojanje specifičnih karotenoida. Najistaknutiji primjeri su kapsantin i kapsorubin, dominantni pigmenti crvene paprike.⁸⁸

Iako nisu tako široko rasprostranjeni niti strukturno različiti kao u biljkama, karotenoidi se također pojavljuju kod proizvoda životinjskog porijekla. Astaksantin (slika 2.3. C) je glavni karotenoid kod nekih riba, poput lososa i pastrve, kao i kod ljuskara (npr. škampi, jastog i rakovi). U lososu se javlja u tri optička oblika,¹⁰³ a izomeri astaksantina također se nalaze i u škampima te u jastogu gdje su izomeri vezani u plavi kompleks astaksantina, krustacijanin.¹⁰⁴ Na tržištu dostupan, sintetski astaksantin također je u obliku smjese izomera, dok je astaksantin izoliran iz alge *Haematococcus* sp. optički čist (3*S*, 3'*S*) izomer. Intermedijeri u transformaciji karotenoida do astaksantina, kao što su kantaksantin, ehinenon, izokriptoksantin i izozeaksantin, često su detektirani kao manje zastupljeni karotenoidi. Tunaksantin u raznim stereoizomernim oblicima također je glavni karotenoid u ribama. Astaksantin se može naći u slobodnom obliku, esterificiran u jednoj ili obje hidroksilne skupine s masnim kiselinama ili kao kompleks s proteinima (karotenoproteini) ili lipoproteinima (karotenolipoproteini).¹⁰⁵ Astaksantin u rakovima uvijek je smjesa tri oblika. U algama je uvijek u esterificiranom obliku, dok sintetski astaksantin nije esterificiran.¹⁰⁶ U crvenom raku (*Pleuroncodes planipes*), izolirani astaksantin sastoji se od diestera, monoesterificiranog i neesterificiranog astaksantina.¹⁰⁷ Fukoksantin je među najbrojnijim karotenoidima u prirodi, iako je ograničena njegova pojava u hrani. Pronađen je u jestivim smeđim algama^{108–110} koje se uglavnom konzumiraju u azijskim zemljama. Ima složeniju strukturu od većine karotenoida koji se nalaze u prehrambenim namirnicama jer sadrži alenilnu vezu, nekoliko funkcionalnih supstituenata, uključujući sekundarne i tercijarne hidroksilne, epoksi i keto skupine.

2.3.3. Svojstva

Glavne strukturne značajke koje utječu na promjene svojstava i biološku aktivnost karotenoida su duljina i krutost strukture molekule, duljina konjugirane dvostruke veze, cikličke ili linearne krajnje skupine i prisutnost polarnih supstituenata u pretežno ugljikovodičnoj molekuli. Fizikalna i kemijska svojstva karotenoida *in vitro* daju važne informacije, no ova svojstva *in vivo* pod utjecajem su različitih čimbenika, uključujući interakcije s drugim molekulama u

njihovoj mikro sredini i mogu se značajno razlikovati od slobodnih karotenoida u otopini organskog otapala. Stoga, ekstrapolaciju rezultata dobivenih *in vitro* u situacijama *in vivo* treba uzeti s oprezom.⁸⁸ Dalje u tekstu su opisana glavna svojstva karotenoida od interesa koja uključuju:

1. Apsorpciju svjetlosti
2. Pigmentaciju
3. Funkciju u staničnim membranama
4. Antioksidativni i prooksidativni učinak
5. Interakcije s drugim antioksidansima

1. Apsorpcija svjetlosti

Karakteristična značajka strukture karotenoida je dugi konjugirani sustav dvostrukih veza koji apsorbira svjetlost u visokoenergetskom dijelu vidljivog dijela elektromagnetskog spektra (400 – 500 nm). Konjugirani polienski sustav daje im posebna fotokemijska svojstva koja čine osnovu za različite biološke interakcije sa svjetlošću. Pokazalo se da konjugirani sustav dvostruke veze posjeduje i druga svojstva koja bi živi organizmi mogli koristiti. S razvojem procesa fotosinteze koji omogućuje nastanak kisika, okoliš je postao aeroban, a živi organizmi su pod pozitivnim i negativnim djelovanjem procesa nastanka svjetlosti i stvaranja kisika. Proces fotosinteze, naime, također uključuje i stvaranje vrlo reaktivne i štetne vrste singletnog kisika, $^1\text{O}_2$. Karotenoidi su se u ovom štetnom procesu pokazali kao vrlo učinkoviti spojevi u zaštiti od stvaranja $^1\text{O}_2$ i obrani od negativnih učinaka. Svjetlosna energija koju apsorbiraju karotenoidi prenosi se iz pobuđenog singletnog stanja karotenoida u klorofil pomoću singlet-singlet prijenosa energije. Svjetlost valnih duljina koje karotenoidi apsorbiraju, a klorofil ne, može se koristiti kao izvor energije za fotosintezu. Alge i fototrofne bakterije sadrže različite vrste karotenoida, no oni imaju slično djelovanje u procesu fotosinteze. U mnogim slučajevima, doprinos karotenoida u skupljanju svjetlosti, veći je nego kod viših biljaka jer manje svjetlosti dolazi do okoliša u kojem žive organizmi. Određeni kompleksi pigment-proteini bogati karotenoidima, npr. fukoksantin-klorofil-proteini diatom, razvili su se kako bi se nekim algama omogućila najbolje iskoristivost dostupne svjetlosti u podmorju. Koncentracija karotenoida može biti veća od koncentracije klorofila.¹¹¹

Visoko na popisu funkcija koje se vežu uz karotenoide je "fotozaštita", tj. zaštita od oštećenja nastalih djelovanjem svjetlosti. Budući da je pohranjena svjetlosna energija u fotosintezi neophodna za održavanje života na Zemlji, svjetlost se obično smatra isključivo korisnom. Svjetlosna energija, međutim, naročito u kombinaciji s kisikom, može biti vrlo štetna, uzrokujući oštećenja stanica i tkiva putem singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) i oksidacijom slobodnim radikalima. Živi organizmi su razvili obrambene mehanizme kako bi spriječili ili umanjili ovo štetno djelovanje. Karotenoidi čine glavni dio obrane i mogu biti učinkoviti na više načina. Mogu djelovati kao filter, sprječavajući prodiranje štetnih valnih duljina svjetlosti u osjetljiva tkiva. "Sekundarni karotenoidi" koji se mogu nakupiti u vrlo visokim koncentracijama u nekim zelenim algama u uvjetima stresa¹¹², uključujući i visoko intenzivno sunčevo zračenje, vrlo su učinkoviti filteri štetnog zračenja. Zbog toga se komercijalno koriste za proizvodnju β -karotena iz alge *Dunaliella salina* i astaksantina iz alge *Haematococcus pluvialis*.

Fovea, najosjetljiviji dio mrežnice oka kod ljudi i drugih primata, sadrži malo žuto područje nazvano žuta pjega (lat. *macula lutea*), koja sadrži vrlo visoku koncentraciju ksantofila zeaksantina i luteina.¹¹³ Karotenoidi pružaju zaštitu od svjetlosti visokog intenziteta koja je usmjerena na fovealni dio oka i važna je obrana od makularne degeneracije povezane sa starenjem što može dovesti do slabljenja vida i sljepoće kod starijih osoba. Međutim još uvijek se ne zna točno na koji način karotenoidi pružaju zaštitu, odnosno djeluju li kao svjetlosni filter, uklanjaju štetno visokoenergetsko plavo svjetlo ili imaju zaštitnu ulogu protiv oksidativnih oštećenja. Kod nekih ptica, uz različite fotoreceptore osjetljive na plavu, crvenu i zelenu svjetlost, stanice mrežnice također sadrže obojene uljne kapljice (crvena, žuta, zelenkasto-žuta) kroz koje svjetlost mora proći kako bi dosegla fotoreceptore.¹¹² Pigmentiranje karotenoidima rožnice oka kod riba nije imalo značaja u njihovom doživljaju boja, no služili su kao zaštitni filteri plavog svjetla.¹¹⁴

2. Pigmentacija

Tvari koje imaju svojstvo apsorpcije svjetlosti u jednom dijelu vidljivog dijela elektromagnetskog spektra (380-750 nm), preostali dio reflektiraju ili propuštaju. Boja koja će se vidjeti ovisi o valnim duljinama maksimalne apsorpcije. Karotenoidi imaju vrlo široku prirodnu raspodjelu u biljkama, životinjama i mikroorganizama te imaju iznimno važno mjesto

među različitim skupinama prirodnih pigmenata, zajedno s polifenolnim flavonoidima, tetrapirolima poput klorofila i inertnim polimernim melaninima. Većina ovih pigmenata je odavno prisutna te su imali druge važne biološke funkcije prije nego što je boja postala značajan faktor.⁸⁷

Budući da su π elektroni dugog sustava konjugirane dvostruke veze visoko delokalizirani, a pobuđena stanja relativno niske energije, potrebna energija pobude je relativno mala te odgovara svjetlosti u vidljivom području u rasponu valnih duljina od 400 do 500 nm. Karotenoidi stoga imaju svijetle boje. Prijelaz koji se dešava je $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelaz u kojem je jedan od veznih π elektrona konjugiranog sustava dvostruke veze prešao na prethodno neokupiran π^* protuvezne orbitale. Konjugirani sustav dvostruke veze je kromofor koji daje karotenoidima njihovu boju i osigurava vidljive apsorpcijske spektre koji služe kao osnova za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. U strukturi je potrebno najmanje 7 konjugiranih dvostrukih veza da bi karotenoid imao vidljivu boju. Tako na primjer ζ -karoten ima svijetložutu boju. Fitoen ima 3 konjugirane dvostruke veze, a fitofluen ima 5 konjugiranih dvostrukih veza te su zbog toga bezbojni. Likopen s 11 konjugiranih dvostrukih veza u acikličkoj strukturi je crvene boje. Ciklizacijom se, zbog steričkih smetnji između metilne skupine prstena na C-5 i vodika na C-8 polienskog lanca, π elektroni premještaju iz dvostruke veze prstena izvan ravnine sa onima u lancu. Zbog toga monociklički γ -karoten i biciklički β -karoten, iako posjeduju isti broj konjugiranih dvostrukih veza kao likopen, imaju crveno-narančasto i žuto-narančasto obojenje. Hidroksi supstituenti ne utječu na kromofor, tako da su i α -karoten i njegov dihidroksi derivat, lutein, blijedožuti. Slično, monohidroksi i dihidroksi derivati β -karotena, β -kriptoksantin i zeaksantin imaju isto obojenje kao β -karoten. Kapsantin, sa svojim konjugiranim sustavom dvostrukih veza koji se sastoji od devet dvostrukih veza u polienskom lancu, jednom u β -prstenu te od dvostruke veze karbonilne skupine, i kapsorubin, s devet konjugiranih dvostrukih veza u polienskom lancu produženom dvostrukim vezama dvije karbonilne skupine, daju intenzivnu boju crvenoj paprici. Astaksantin koji ima devet konjugiranih dvostrukih veza u polienskom lancu produženom dvjema dvostrukim vezama u β -prstenima i dvjema dvostrukim vezama karbonilnih skupina, odgovoran je za intenzivnu crvenu boju.⁸⁸

Biljke su uglavnom zelene boje zbog prisutnosti klorofila te je zbog toga boja karotenoida uglavnom nevidljiva, iako se ovi spojevi nalaze u kloroplastu zelenog lišća. Različite vrste cvijeća i voća imaju različite boje, a karotenoidi su uglavnom zaslužni za žuto i narančasto obojenje, a ponekad i za crveno, kao u slučaju rajčice i čili paprika (lat. *C. annuum*).

Karotenoidi se najčešće nalaze u gornjem dijelu biljke ili u plodu koji raste iznad površine tla, no postoje i iznimke kao na primjer, mrkva i slatki krumpir (batat). Mikroorganizmi su isto često obojeni upravo zbog prisutnosti karotenoida.¹¹⁵ Neki mikroorganizmi se prvenstveno i komercijalno koriste kako bi se proizveli karotenoidi. Važnost karotenoida kod ovih organizama leži u ulogama zaštite od štetne svjetlosti, jačanju membrane i slično, a ne u obojenju.⁸⁷

Životinje koriste boju u različite svrhe, poput signaliziranja i upozorenja. Obojenje djelovanjem karotenoida je široko rasprostranjeno, posebice kod ptica, riba, insekata i morskih beskralježnjaka.^{117, 118} U perju, karotenoidi su povezani s keratinom, strukturnim proteinom osovine perja. Životinje ne biosintetiziraju karotenoide koje akumuliraju, već ih moraju dobiti iz prehrane, iako se dijetetski karotenoidi mogu strukturno modificirati. Životinje u zatočeništvu, npr. ptice u kavezima, akvarijske ukrasne ribe, ribe i rakovi u akvakulturi, također moraju dobivati karotenoide kroz hranu radi održavanja ili poboljšanja boje i svjetline. Osim za tipično žuto, narančasto i crveno obojenje, karotenoidi su također odgovorni za neka ljubičasta, zelena i plava obojenja. Ove boje nastaju zbog karotenoproteinskih kompleksa, koji su specifične, stehiometrijske kombinacije karotenoida i proteina. Vezanje obično nije kovalentno, no karotenoid je vezan na takav način da se njegova svojstva apsorpcije svjetlosti drastično mijenjaju što dovodi do znatnih batokromskih pomaka (tj. pomaka valnih duljina) i nastanka ljubičasto-plavih boja. Karotenoproteini su široko rasprostranjeni u mnogim beskralježnjacima, posebno onima u morskom okolišu. Smatra se da karotenoproteini mogu poslužiti za maskiranje životinja u prevladavajućim uvjetima podmorske svjetlosti, služe kao opći fotoreceptori ili pružaju zaštitu od mogućih štetnih učinaka svjetlosti. U dermisu nekih kralježnjaka, različiti tipovi kromatofora, obično ne u jednakom broju, povezani su u jedinicu kromatofore kože koja može dovesti do brzih promjena boje.^{119, 120} Promjene u boji nastaju brzo zbog varijacija u doprinosu različitih tipova stanica u funkcionalnoj jedinici, obično raspršivanjem ili agregacijom pigmentnih čestica ili granula unutar kromatofora, uključujući žuto-narančaste karotenoide u ksantoforama ili eritroforama, tako da oni daju manji ili veći doprinos boji, na primjer, kako bi životinja odgovarala boji svoje pozadine. Sporije promjene tijekom dugoročne prilagodbe pozadini zahtijevaju akumulaciju povećane količine pigmenta. Glavni ograničavajući faktor je svjetlost, a proces je pod hormonskom kontrolom. Pokazano je da rakovi posjeduju odijeljene pigment-disperzivne hormone i pigment-koncentrirajuće

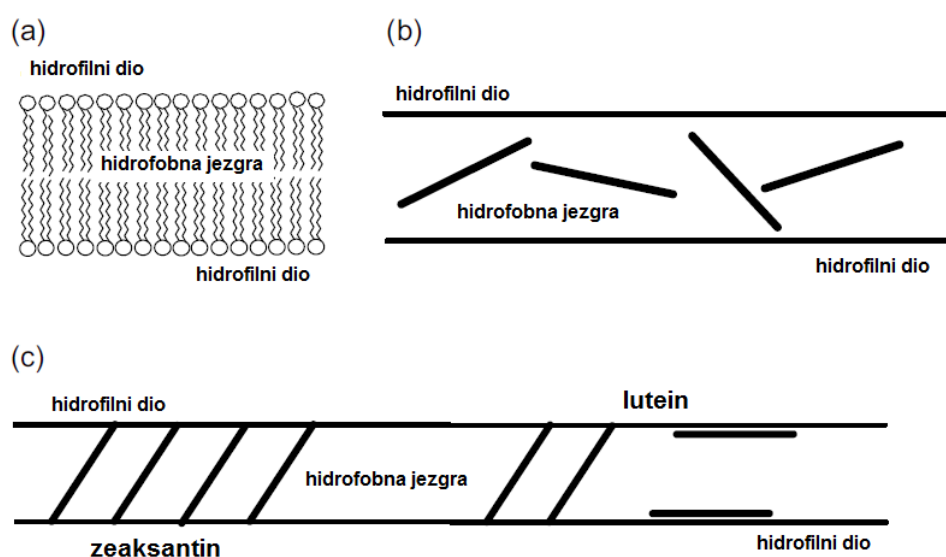
hormone za crne, bijele i crveno-narančaste pigmente.¹²⁰ Svi ovi hormoni nastaju na mjestima gdje se nalaze receptori pigmenata koji otkrivaju promjene pozadinske boje.⁸⁷

3. Funkcija u staničnim membranama

Karotenoidi se, zbog izrazite hidrofobnosti, vežu uz lipide (ulja, masti) ili se nalaze u hidrofobnim strukturama kao što su membrane. Hidrofobne molekule se isto tako često nalaze i u prirodnim membranama te su sastavni dio kompleksne membranske strukture. Zbog toga se karotenoidi vežu u lipidni dio membranskog dvosloja, no koncentracija koja se može postići, orijentacija specifičnog karotenoida u membrani i njegovi učinci na svojstva membrane ovise o strukturnim osobinama kao što su veličina i oblik karotenoida te prisutnost funkcionalnih grupa. Acilni lanci lipidnog dijela dvosloja tvore fluidnu hidrofobnu jezgru membrane, a skupine polarnih glava na vanjskoj strani membrane reagiraju s vodenim medijem (slika 2.4. a). Živi organizmi sadrže različite polarne lipide s različitim duljinama ugljikovodičnih lanaca i razinama nezasićenosti te različitim polarnim skupinama. Međutim, prirodne membrane nisu samo jednostavni dvosloji, već mogu sadržavati i druge lipidne komponente kao što su kolesterol i proteini, koji mogu biti integralni ili periferni. Na različitim temperaturama, fosfolipidne membrane mogu postojati u različitim fazama, tj. u čvrsto složenom gelu, krutoj fazi ispod minimalne temperature tranzicije, ili kao tekuće-kristalna faza iznad navedene temperature.^{87, 121}

Većina istraživanja vezanih uz strukturu i dinamiku membrana i interakcije različitih komponenata nije na prirodnim membranama, već modelnim membranskim dvoslojima (liposomima) koji se dobivaju iz zasićenih ili nezasićenih fosfolipidnih molekula koje spontano tvore vezikule kada se rasprše u vodenom mediju. Karotenoidi i druge komponente se mogu ugraditi u te strukture pri određenim koncentracijama prilikom pripreme liposoma. Struktura u obliku štapića, prisutnost polarnih krajnjih grupa i dimenzije molekule tipičnog karotenoida, koja odgovara debljini dvosloja, izravno su odgovorni za lokalizaciju i orijentaciju molekula karotenoida unutar membrane i za svojstva membrane.^{121–123} Karoteni kao što su β -karoten ili likopen su posve lipofilni i ostaju unutar unutarnjeg dijela dvosloja sastavljenog od ugljikovodika. Prosječna orijentacija ovih karotenoida je okomita duga os na acilne lance lipida (slika 2.4. b). Polarni supstituenti karotenoida, osobito hidroksilne skupine, ne mogu lako prodrijeti u hidrofobnu jezgru dvosloja pa se oni povezuju s polarnim glavama membrane.

Dihidroksikarotenoid zeaksantin proteže se preko dvosloja s jednom polarnom krajnjom grupom povezanom sa polarnom površinom (slika 2.4. c, lijevo). Male razlike u strukturi mogu dovesti do značajnih razlika u svojstvima vrlo sličnih karotenoida. Zeaksantin i lutein se razlikuju samo u položaju jedne dvostruke veze u jednom od prstena i u stereokemiji na C(3'), međutim dok se zeaksantin nalazi u orijentaciji koja obuhvaća membranu, lutein se nalazi u dva oblika. Jedan, poput zeaksantina, obuhvaća membranu, a drugi je usmjeren vodoravno u odnosu na membranu (slika 2.4. c, desno).



Slika 2.4. (a) Dijagramski prikaz fosfolipidnog dvosloja u staničnoj membrani. (b) Lokalizacija spojeva kao što su β-karoten i likopen u različitim orijentacijama u hidrofobnom dijelu dvosloja. (c) Orijentacija zeaksantina, obuhvaćajući membranski dvosloj (lijevo) i luteina s nekim molekulama koje obuhvaćaju dvosloj, a druge leže horizontalno u blizini hidrofilnog dijela membrane (desno).⁸⁷

Stupanj agregacije molekula karotenoida u membranama i učinci karotenoida na membransku strukturu i dinamiku snažno utječu na fizičko stanje membranske lipidne faze. Peroksidacija nezasićenih acilnih lanaca uzrokuje poremećaj u membranama. Proučavana je sposobnost karotenoida da štite liposomske membrane od oksidativnog oštećenja uzrokovanog slobodnim radikalima dobivenim putem azo-inicijatora.¹²⁴ β-karoten i likopen, koji se nalaze u unutrašnjem, hidrofobnom dijelu dvosloja, djelotvorni su samo protiv slobodnih radikala nastalih u ovom unutrašnjem sloju. Nasuprot tome, zeaksantin, koji obuhvaća membranu sa svojim hidroksilnim

skupinama te na taj način prodire i u vanjsku polarnu zonu, bio je u stanju zaštititi od oštećenja radikalima dobivenih u vodenoj fazi. Bilo koji zaštitni učinak karotenoida protiv oštećenja membrane *in vivo* ovisi o tome koji je karotenoid prisutan, njegovoj poziciji i orijentaciji u dvoslojima te mjestu gdje se stvaraju slobodni radikali koji oksidiraju.⁸⁷

4. Antioksidativni i prooksidativni učinak

Karotenoidi su prirodni antioksidansi važni u prehrambenim namirnicama te su posljedično, važni za zdravlje ljudi. Mogu poboljšati stabilnost i produžiti rok trajanja hrane. Posljednja dva do tri desetljeća većina istraživača više istražuje antioksidativnu ulogu karotenoida prisutnih u hrani u očuvanju ljudskog zdravlja, nego istu ulogu u samoj hrani. Antioksidativna svojstva karotenoida posljedica su njihove izuzetne sposobnosti za gašenje singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) i hvatanje slobodnih radikala.⁸⁸

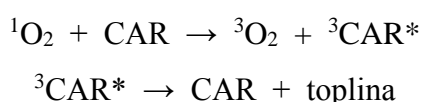
Konjugirani polienski sustav bogat elektronima u kemijskoj strukturi čini karotenoide vrlo osjetljivima na oksidaciju i reakcije sa slobodnim radikalima. Slobodni radikali mogu se generirati na puno načina u stanicama i tkivima, a živi organizmi trebaju učinkovitu obranu protiv njihovog štetnog djelovanja. U prisutnosti slobodnih radikala koji se lako oksidiraju, nezasićeni lipidi uništavaju se putem lančanih reakcija koje uključuju peroksil radikale. 1984. godine objavljeno je da β -karoten u otopini može reagirati s peroksil radikalima što dovodi do stvaranja stabilnog radikala te da pri relativno niskoj koncentraciji kisika ovaj proces neutralizira peroksil radikale što ide u korist pretpostavci da karotenoidi mogu djelovati kao antioksidansi.¹²⁵ Od tada, mogućnost karotenoida kao zaštitnih antioksidansa u biološkim sustavima postalo je glavno područje interesa u njihovom istraživanju. Mnogi eksperimenti su potvrdili da, pod definiranim uvjetima u modelnim sustavima, karotenoidi mogu biti učinkoviti antioksidansi. Također je poznato da, pod različitim uvjetima, posebice u prisutnosti relativno visokih koncentracija kisika, karotenoidi mogu imati i prooksidativno djelovanje.

Dokazano je da karotenoidi učinkovito gase aktivnost $^1\text{O}_2$ te su pripremljeni i neki sintetički modeli i analozi koji su se pokazali boljim antioksidansima od prirodnih karotenoida. Astaksantin je klasificiran kao izvrstan antioksidans koji vrlo učinkovito gasi i pobuđena tripletna stanja, čime se sprječava formiranje $^1\text{O}_2$, i radikale u osnovnom stanju. Uz navedeno, jedini od svih karotenoida nema prooksidativno djelovanje. β -Karoten i likopen su dobri antioksidansi koji mogu snažno inhibirati formiranje peroksida, međutim prilikom toga se

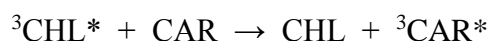
razgrađuju. Zaštita karotenoida od oksidacije je ključan uvjet za njihovu učinkovitost u biološkom djelovanju.⁸⁷

a) Gašenje singletnog kisika

Fotosenzibilizatori u biološkim sustavima (npr. klorofil, riboflavin, mioglobin) mogu apsorbirati energiju svjetlosti te u svojem pobuđenom tripletnom stanju, prenijeti energiju na atmosferski kisik u tripletnom stanju ($^3\text{O}_2$), stvarajući visoko reaktivni i destruktivni singletni kisik ($^1\text{O}_2$). Karotenoidi se u ovaj proces mogu uključiti na dva načina: (1) deaktiviranjem fotosenzibilizatora u tripletnom stanju čime se sprječava nastajanje singletnog kisika, i (2) pretvaranjem kisika u singletnom stanju natrag u osnovno, tripletno stanje. U oba slučaja, prenesena energija se oslobađa kao toplina. Poznato je da karotenoidi gase singletni kisik ($^1\text{O}_2$).^{126–128} To se događa ili fizikalnim ili kemijskim gašenjem, a djelotvornost fizikalnog je znatno veća od kemijskog gašenja. Fizikalno gašenje uključuje prijenos energije ekscitacije od $^1\text{O}_2$ na karotenoid, kisik se zatim vraća u osnovno stanje, a karotenoid se pobuđuje do tripletnog stanja. Energija se raspršuje kroz rotacijske i vibracijske interakcije između pobuđenog karotenoida i okolnog otapala te nastaje karotenoid u osnovnom stanju i oslobađa se toplinska energija. Karotenoid ostaje nepromijenjen i može doći do daljnjih ciklusa gašenja kisika.



Kod kemijskog gašenja, karotenoid se kombinira s kisikom ili se oksidira što dovodi do njegovog uništavanja (nestanka boje) i nastanka oksidiranih produkata. Karotenoidi također mogu ugasiti klorofil u pobuđenom tripletnom stanju ili druge pobuđene senzibilizatore, čime se sprječava stvaranje $^1\text{O}_2$.

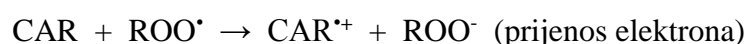


Sposobnost gašenja karotenoida povećava se povećanjem broja konjugiranih dvostrukih veza, odnosno maksimalnu zaštitu imaju karotenoidi s devet ili više dvostrukih veza.¹²⁹ U manjoj mjeri, na ovaj proces gašenja također utječu krajnje karotenoidne skupine (cikličke ili

acikličke) i priroda supstituenata u cikličkim krajnjim skupinama. Gašenje kisika ovisi i o okolišu. Spojevi koji učinkovito gase $^1\text{O}_2$ u otapalima mogu biti neučinkoviti u staničnoj membrani.¹³⁰ Agregacija i orijentacija karotenoida u lipidnom dvosloju mogu biti glavni čimbenici u određivanju djelotvornosti gašenja $^1\text{O}_2$. Singletni kisik uključen je u fotooksidaciju biljnih ulja i hrane koja sadrži ulje. Dodavanje različitih karotenoida u hranu koja sadrži nezasićene masne kiseline poboljšava vrijeme skladištenja, uglavnom zbog gašenja $^1\text{O}_2$.^{88, 131}

b) Hvatanje slobodnih radikala

Iako nisu učinkoviti kao kod gašenja $^1\text{O}_2$, karotenoidi također mogu hvatati slobodne radikale i na taj način spriječiti propagaciju lanca. Interakcija sa slobodnim radikalima može se desiti na tri načina:^{132–134}



Faktori koji mogu utjecati na brzinu i mehanizme reakcija slobodnih radikala uključuju prirodu slobodnog radikala i njegovu okolinu (vodena ili lipidna) te strukturne karakteristike karotenoida (broj konjugiranih dvostrukih veza, jesu li ciklički ili aciklički, polarni ili nepolarni).^{134, 136–138} Priroda radikalskih vrsta ima veći učinak na reakcije od strukture karotenoida.^{137, 139} Karotenoidi reagiraju s velikim brojem radikala, kao što su $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$, RSO_2^\bullet , NO_2^\bullet i s različitim arilperoksilnim radikalima putem prijenosa elektrona stvarajući radikalski kation $\text{CAR}^{\bullet+}$.^{136, 137, 140} Kod radikala koji slabije oksidiraju, kao što su alkilperoksilni radikali, dolazi do prijenosa vodikovog atoma, što dovodi do nastanka neutralnog karotenoidnog radikala.¹³⁹ Prijenos atoma vodika (eng. *hydrogen atom abstraction/transfer*, *HAT*), karakterističan za oksidaciju lipida, često je predložen kao mehanizam antioksidativne aktivnosti karotenoida.^{141, 142} Pokazano je da svi alkilni, alkoksilni i alkilperoksilni radikali reagiraju s β -karotenom¹⁴², međutim, reakcija s peroksilnim radikalima je znatno sporija, nego s alkilnim i alkoksilnim radikalima, što ukazuje na to da je β -karoten slabi direktni hvatač peroksilnih radikala. Predloženo je da hvatanje peroksilnih radikala ovim karotenoidom ne ide putem prijenosa elektrona, već stvaranjem adukata i/ili prijenosom atoma vodika. Formiranje

karotenoidnog radikala isto tako ovisi o polarnosti otapala u kojemu se nalazi.¹⁴¹ Dodatni radikali formiraju se samo u apolarnim otapalima, dok se u polarnim otapalima raspadaju na karotenoidne radikal katione. β -Karoten radikal kationi i adukti visoko su stabilizirani rezonancijom i dolazi do polaganog bimolekularnog raspadanja do neradikalnih produkata.¹³⁵ Kod hvatanja peroksilnih radikala nastalih iz lipida (LOO^\bullet), karotenoidni radikali su manje reaktivni od LOO^\bullet pa karotenoidi djeluju kao antioksidansi koji razgrađuju lanac prilikom lipidne peroksidacije. Karotenoidi se također mogu smanjiti, stvarajući radikal anione. Ravnoteža između donacije elektrona i prihvatanja elektrona koja omogućuje nastanak radikal kationa i radikal aniona, ovisi o karotenoidu i važna je u njihovoj ulozi antioksidansa.¹³⁴ Strukturne karakteristike karotenoida povezane su ne samo s njihovom reaktivnošću, već i njihovom lokacijom i orijentacijom unutar lipidnog dvosloja⁸⁹, pa čak i s njihovom sposobnošću samoagregiranja u polarnim uvjetima.^{88, 143}

c) Prooksidativna svojstva

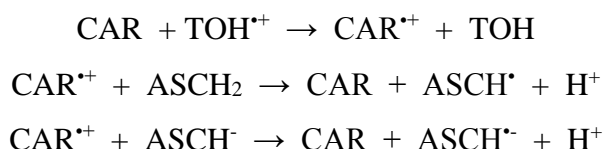
Istraživanje mogućih prooksidativnih svojstava karotenoida započelo je kao posljedica provođenja studija koje su pokazale porast, a ne smanjenje pojave raka pluća kod ljudi koji su koristili dodatke prehrani s β -karotonom.¹⁴⁴ Karotenoidi se mijenjaju od antioksidansa do prooksidansa, ovisno o njihovom redoks potencijalu i biološkom okruženju. Pretpostavka da karotenoidi mogu biti prooksidansi potekla je iz istraživanja gdje je pokazano da se β -karoten ponaša kao prooksidans pri visokim, nefiziološkim uvjetima kisika (760 torr, 100% kisika) i kod visoke koncentracije karotenoida ($> 500 \mu\text{M}$).¹²⁵ Međutim, pregledom tih istraživanja, zaključeno je da rezultati sugeriraju smanjenje antioksidativne aktivnosti pri tim uvjetima, a ne nužno prooksidativni učinak.¹²⁷ Štoviše, tlak kisika u plućima je samo 150 torra za udahnuti zrak i brzo se spušta na 15 torr ili manje u tkivima te pri tim tlakovima nije bilo naznaka smanjenja antioksidativne aktivnosti. Također, dokaz o prooksidativnom djelovanju je dobiven pri visokim, nefiziološkim koncentracijama β -karotena ($50 \mu\text{M}$). Provođenjem dodatnih istraživanja, dobivene su koncentracije β -karotena između 20 i 25 mg/dan kroz dulji vremenski period te se koncentracija β -karotena u plazmi kretala u rasponu od 0.4 do 5 μM , znatno ispod razina za koje je prijavljeno da djeluju prooksidativno. Također je važno uzeti u obzir da su studije o antioksidativnom-prooksidativnom potencijalu provedene s karotenoidima otopljenim u organskim otapalima. U biološkim sustavima, ovi se spojevi pretežno nalaze povezani s

proteinima ili lipoproteinima i, u ovom stanju, ponašaju se različito od onih u otopini organskog otapala.^{89, 133}

Čimbenici koji mogu utjecati na antioksidativne ili prooksidativne aktivnosti karotenoida u biološkim sustavima su: (1) struktura (tj. veličina, oblik te priroda, položaj i broj supstituenata) i fizički oblik (agregirani ili monomerni, *Z* ili *E* konfiguracija itd.) molekule karotenoida, (2) mjesto djelovanja molekule karotenoida unutar stanice, (3) potencijal moguće interakcije s drugim karotenoidima ili antioksidansima (posebno vitaminima C i E), 4) koncentracija samog karotenoida i (5) parcijalni tlak kisika.^{90, 133}

5. Interakcije s drugim antioksidansima

U ljudskom organizmu karotenoidi su dio antioksidativnog zaštitnog sustava jer sinergistički djeluju i reagiraju s drugim antioksidansima.¹⁴⁵ Kombinacije karotenoida ili pojedinačni oblici s drugim antioksidansima su djelotvorniji u djelovanju, nego pojedinačne molekule. Truscott (1996)¹⁴⁶ je predložio mehanizam interakcije vitamina C i E sa β -karotenom gdje molekula karotenoida neutralizira radikal vitamina E što rezultira nastankom karotenoid radikal kationa kojeg onda neutralizira vitamin C. Ovaj proces se dešava isključivo u prisutnosti vitamina C.



Istraživanjima na crvenom palminom ulju pokazano je da karoteni predstavljaju primarni supstrat za lipidne radikale, a tokoferoli/tokotrienoli regeneriraju karotene.¹⁴⁷ Pokazalo se da sinergistički učinak ovisi o vrsti antioksidansa i njegovoj koncentraciji.¹⁴⁸ U homogenoj otopini metil estera linoleinske kiseline i u oksidaciji metil estera linoleinske kiseline inducirane azo-inicijatorom, likopen je djelovao sinergistički s vitaminom E u točno određenoj koncentraciji i omjeru, dok β -karoten nije pokazao sinergistički učinak s vitaminom E. Također je zabilježen sinergistički odgovor između samih karotenoida.¹⁴⁹ Utvrđeno je da je kombinacija luteina i likopena najučinkovitija protiv 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) inicijatora koji inducira oksidacije u multilamelarnim liposomima. U fosfatidil kolin liposomu kombinacija astaksantina s β -karotenom ili astaksantina s likopenom pokazala je

značajan antioksidativni synergizam.⁶ Predloženo je da astaksantin, kad se nalazi na granici međufaza voda/lipid, djeluje kao prijenosni most radikala, hvata radikale na međufazi i prenosi elektron s nepolarnog i redukcijskog karotenoida u unutrašnjost membrane. Skibsted¹³⁴ je predložio da karotenoidi tvore antioksidativne mreže na temelju razmjene jednog elektrona s drugim karotenoidima, ovisno o ravnoteži između ionizacijske energije i afiniteta za elektrone pojedinih karotenoida. Hidrofilniji ksantofili služe kao molekularna mreža preko membrane, vežući se na međufazi voda/lipid, što dovodi do synergizma s više lipofilnih karotenoida. Također je zabilježen synergizam između izoflavonoida i β -karotena^{150–152} te uključuje regeneraciju karotenoid radikal kationa formiranog u lipidnoj fazi s izoflavonoidom na međufazi lipid/voda.

Monoanionski i dianionski oblici izoflavonoida također regeneriraju oksidirani karotenoid¹⁵¹ te je ova mogućnost u hrani prednost jer su karotenoidi učinkoviti u gašenju singletnog kisika ($^1\text{O}_2$), no nisu djelotvorni u hvatanju slobodnih radikala, dok su polifenoli vrlo dobri hvatači slobodnih radikala, ali nisu učinkoviti u gašenju $^1\text{O}_2$.⁸⁸

2.4. Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode koje se koriste za određivanje antioksidativnog kapaciteta, uz sve dosad otkrivene, dodatno se razvijaju i modificiraju. One predstavljaju brzu, jednostavnu i osjetljivu alternativu u analizi bioaktivnih tvari povezanih s hvatanjem radikala kao i samim antioksidativnim kapacitetom. Uglavnom su jeftine i ne zahtijevaju dugu pripremu uzoraka. Koriste se u stacionarnim sustavima, gdje struja ne prolazi između dvije elektrode i koncentracija analita u elektrokemijskoj ćeliji ostaje nepromijenjena. Električni napon koji nastaje između elektroda uspostavlja se spontano odvijanjem elektrokemijskih reakcija na elektrodama.^{154, 155} Također se koriste i u dinamičkim, elektromigracijskim sustavima gdje struja prolazi kroz otopinu analita, a koncentracija se mijenja zbog redoks reakcije. U ovim sustavima prednost je voltametrijskih^{155–160} i amperometrijskih metoda.^{161–165} Dinamički sustavi se uglavnom koriste za brzu i osjetljivu analizu i kvantifikaciju jednostavnih analita, dok su stacionarni sustavi primjenjivi za kvantifikaciju ograničenih količina analita te za određivanje strukture kompleksa biomolekula s ciljanim molekulama.¹⁶⁶

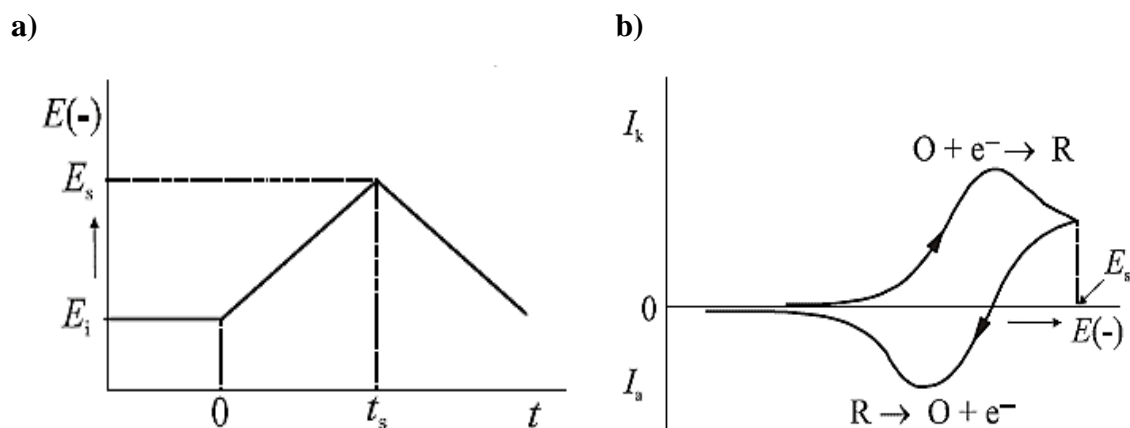
Antioksidansi su tvari koje mogu biti reducensi te se u otopinama mogu lako oksidirati na inertnoj elektrodi. S obzirom na to, odnos između elektrokemijskog ponašanja tvari s

antioksidativnom aktivnošću i njihova rezultirajuća antioksidativna moć (kapacitet) su vrlo zanimljivi jer molekule koje oksidiraju kod nižih potencijala posjeduju visoki antioksidativni kapacitet.¹⁶⁷ Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između koncentracija prooksidansa i antioksidansa. U kliničkoj medicini, direktno određivanje reaktivnih oksidativnih vrsta i markera oksidativnog stresa još uvijek predstavlja problem i izazov. Razina oksidativnog stresa mjeri se kao totalna promjena u antioksidativnom kapacitetu ili u antioksidativnom statusu.^{168–173}

Osim klasičnih voltametrijskih metoda analize koje uključuju određenu pripremu uzorka, poznata je i voltametrija imobiliziranih mikrokristala (eng. *Abrasive Stripping Voltammetry*, AbrSV). Razvili su je Scholz, Nitschke i Henrion¹⁷⁴ 90-tih godina prošlog stoljeća te je omogućila direktnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu krutih uzoraka. Bazira se na prijenosu malih količina krutog uzorka na površinu elektrode. Sva klasična elektrokemijska mjerenja se mogu izvesti na takvom uzorku. Najčešće korištena elektroda u ovoj vrsti analize je parafinom impregnirana grafitna elektroda (PIGE).^{175, 176} Voltametrija imobiliziranih mikrokristala omogućila je veću primjenu elektroanalitičkih tehnika u analizi krutih tvari na jednostavniji i brži način. Pomoću ove metode ispitani su flavonoidi koji se nalaze u grožđu, voću i povrću.^{176–179}

2.4.1. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija (CV) je tip potenciodinamičkog elektrokemijskog mjerenja. U mjerenjima cikličkom voltametrijom, signal pobude radne elektrode, prikazan na slici 2.5., linearno se mijenja s vremenom. Mjeri se od zadane početne do krajnje vrijednosti i nazad te se za to vrijeme mjeri i očitava jakost struje. Kada signal pobude dosegne izabranu vrijednost, mijenja se smjer pomaka potencijala (povratni pomak). Da bi se dobio ciklički voltamogram, izražavaju se vrijednosti promjene struje radne elektrode u ovisnosti o primijenjenom potencijalu. Eksperimentalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su omjer visine polaznog i povratnog vala (anodna i katodna struja, I_a i I_c) i razlika potencijala vrhova katodnog (E_c) i anodnog (E_a) vala. Sve te vrijednosti mogu se iščitati iz voltamograma.^{12, 181}



Slika 2.5. Ciklička voltametrija na stacionarnoj elektrodi: (a) pobuda, (b) odziv.

Ciklička voltametrija je najčešće korištena tehnika za karakterizaciju redoks sustava. Daje informacije o broju redoks stanja, kao i kvalitativne podatke o stabilnosti tih oksidacijskih stanja i kinetici prijenosa elektrona.^{180–184} Uključuje praćenje napona radne elektrode prilikom snimanja anodne struje proizvedene analitom u otopini, koji se oksidira na površini radne elektrode.¹⁸⁵ Nastala struja proporcionalna je ukupnoj koncentraciji analita.¹⁸⁶

Ciklička voltametrija na ugljikovim elektrodama je prikladan postupak za određivanje antioksidativnog kapaciteta, osobito zbog svoje jednostavnosti, brzine i mogućnosti da se koristi direktno u biološkim i ne biološkim uzorcima. Ova metoda pokazala se praktičnom za kvantifikaciju kapaciteta antioksidansa male molekulske mase u krvnoj plazmi, tkivima i biljnim ekstraktima. Analiza pomoću cikličke voltametrije daje informacije o biološkom oksidacijskom potencijalu, E i $E_{1/2}$, koji je povezan sa svojstvima specifične molekule, jačini (I_a) anodne struje i površini ispod anodnog vala (S).¹⁸⁵

2.4.2. Pravokutnovalna voltametrija

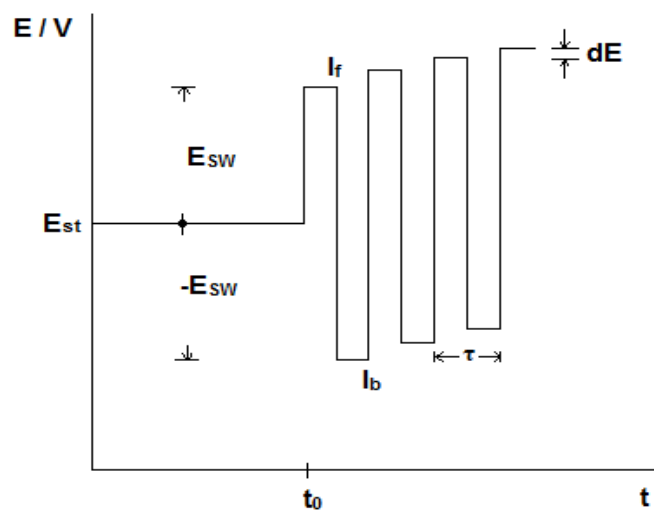
Voltametriju s izmjeničnim naponskim pravokutnim signalom pobude koji je superponiran na stepenasto rastući (padajući) istosmjerni napon (eng. *square wave voltammetry, SWV*) izvorno su predložili Ramaley i Krause, a razvili Osteryoung i suradnici. Prema načinu mjerenja struje odziva slična je diferencijalnoj pulsnoj voltametriji, u kojoj se struja odziva mjeri kao razlika struje odziva prije i za vrijeme trajanja naponskog pulsa.¹⁸⁰

U voltametriji s pravokutnim valovima potencijala, struja se mjeri pri kraju trajanja pozitivne i negativne poluperiode izmjeničnog pravokutnog pulsa. Kao radna elektroda koristi se elektroda stalne površine, npr. viseća živina elektroda, statička živina kap elektroda ili živina film elektroda. U metodi se zapisuje struja odziva kao razlika struja pri jednoj (negativnoj) odnosno drugoj (pozitivnoj) poluperiodi izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude. Pobudni signal u voltametriji s pravokutnim valovima potencijala, kako je pokazano na slici 2.6. (a), karakteriziran je amplitudom pravokutnog naponskog impulsa ($2E_{sw}$), korakom potencijala stepenice (dE_{step}) te širinom, odnosno trajanjem naponskog pulsa (t_p). Trajanje pulsa može se iskazati frekvencijom pravokutnog pulsnog signala $f = 1/2t_p$. Uobičajeno se rabe frekvencije pobude od 1 do 500 Hz.^{161, 181}

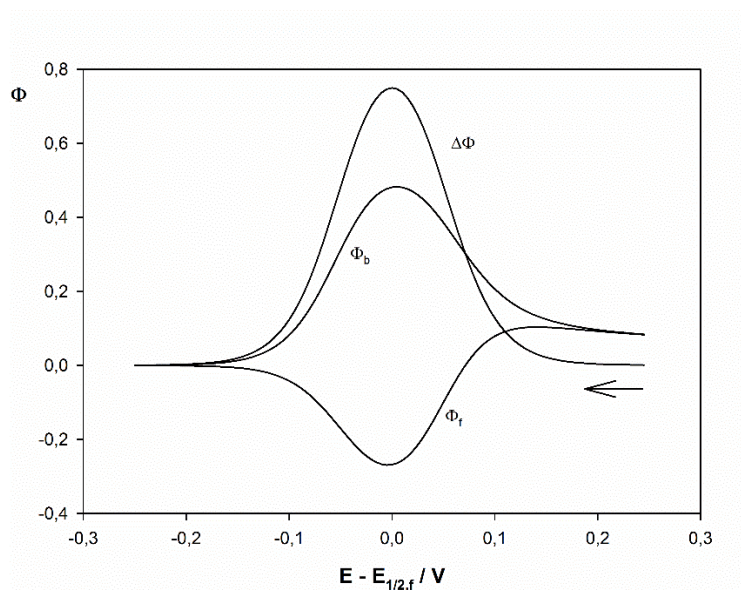
Računalom vođene mjerne naprave omogućuju zapis struje odziva neovisno o tijeku pozitivnih, odnosno negativnih poluperioda i njihove razlike (zbroja). Tako kao rezultat mjerenja imamo tri voltamograma prikazana na slici 2.6. (b), na kojima je prikaz struje ćelije pri pozitivnoj poluperiodi pobude, negativnoj poluperiodi i njihova razlika sve prema potencijalu stube u signalu pobude.¹⁸⁰

Budući da se u voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude struja odziva mjeri pri kraju trajanja pravokutnog pulsa jedne, odnosno druge poluperiode izmjeničnoga signala, odzivni signal sadrži samo komponentu faradejske struje, to jest struju koja se odnosi na redukciju i oksidaciju elektroaktivne vrste. Ne sadrži kapacitivnu komponentu, odnosno sadrži mali postotak kapacitivne komponente, odnosno struje koja se odnosi na nabijanja kondenzatora dvostrukoga sloja.¹⁸⁰ Pravokutnovalna voltametrija je osjetljivija od diferencijalno pulsne voltametrije^{187–190} i ima veći dinamički raspon i nižu donju granicu detekcije u usporedbi s voltametrijom s linearnom promjenom potencijala i cikličkom voltametrijom.^{191–194}

a)



b)



Slika 2.6. Oblik naponskog signala (a) pobude i (b) odziva u voltametrij s pravokutnim valovima potencijala za reverzibilnu elektrodnu reakciju.

2.4.3. Voltametrijske tehnike u analizi kapsaicinoida i karotenoida

Posljednjih godina postoji sve veći interes za primjenu elektrokemijskih (voltametrijskih) tehnika za karakterizaciju bioaktivnih supstanci. Moderne voltametrijske tehnike koriste osjetljive, jeftine i lako primjenjive instrumente te omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Elektrokemijske tehnike imaju relativno široku primjenu u karakterizaciji antioksidansa u hrani i pićima, no njihova primjena u ispitivanju antioksidansa u biološkim uzorcima je i dalje vrlo rijetka. Osim primjene elektrokemijskih tehnika za karakterizaciju bioaktivnih supstanci te mogućnosti jednostavnije pripreme uzorka i manje cijene provedbe analize, ove tehnike pružaju informacije i o fizikalno-kemijskim svojstvima molekula, npr. redoks potencijalu, broju elektrona koji sudjeluju u redoks reakciji, itd. Poznavanje ovih parametara doprinosi boljem razumijevanju oksidacijskog mehanizma i antioksidativne aktivnosti istraživanih spojeva.

Do sada je istraženo nekoliko voltametrijskih metoda za određivanje čistog kapsaicina te kapsaicinoida i njihovih produkata u ljutim paprikama. Također, predložen je i reakcijski mehanizam čistog kapsaicina. Kachoosangi i sur.¹⁹⁵ razvili su adsorptivnu voltametriju na MWCN-BPPGE elektrodi (eng. *multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode*) za detekciju čistog kapsaicina i njegovu kvantifikaciju u različitim uzorcima ljutih umaka. Istražena je metoda adsorptivne voltametrije na BDD elektrodi (eng. *boron-doped diamond*)¹⁹⁶ i jednokratnoj grafitnoj elektrodi (eng. *disposable pencil graphite electrode*)¹⁹⁷ za kvantifikaciju kapsaicina u komercijalno dostupnim sušenim ljutim paprikama. Provedena je i kvantitativna analiza praškastih uzoraka ljutih paprika pomoću voltametrije s linearnom promjenom potencijala (eng. *linear sweep voltammetry*) na grafitnoj elektrodi modificiranoj mezoporoznim silicijevim dioksidom funkcionaliziranim amino grupama.¹⁹⁸ Nedavno provedena istraživanja temeljena na elektrokemijskim metodama pratila su primjenu grafitne „screen-printed“ elektrode^{200, 201} i senzora²⁰¹ za određivanje kapsaicina u realnim uzorcima ljutih paprika i umaka.

Elektrokemijska mjerenja karotenoida su do sada uglavnom provedena u organskim otapalima.^{202–208} Bezvodna aprotička otapala poput heksana, acetonitrila i diklormetana uz 0,1 M tetrabutilamonijev heksafluorofosfat (TBAHFP) kao elektrolit, pokazali su se najboljim sustavima za elektrokemijsku analizu karotenoida. Ispitivani su β -karoten, kantaksantin, zeaksantin, lutein, astaksantin i njihovi različiti supstituenti (esteri, metalni kompleksi, dodavanje surfaktanata itd.) pomoću cikličke i pravokutnovalne voltametrije na platinskoj²⁰⁵,

²⁰⁶, zlatnoj²⁰⁹ i grafitnoj²⁰³ elektrodi te elektrodi od staklastog ugljika²¹⁰. U diklormetanu oksidacija se odvijala u dva reverzibilna stupnja, s kationskim radikalom kao intermedijerom i dikationom kao konačnim produktom.^{202–205} Međutim, u acetonitrilu i drugim polarnim otapalima, dikation se otapa snažnije nego kationski radikal. Prema tome, standardni potencijal drugog elektronskog prijelaza je niži od potencijala prvog prijelaza elektrona. Stoga se oksidacija pojavljuje u jednom dvoelektronskom koraku.^{206–208}

Okolina u prirodnim sustavima u kojoj se dešavaju kemijski procesi je vrlo različita od okoline u organskim otapalima, a karotenoidne vrste koje su prisutne obično brzo gube aktivnost. Karotenoidi se mogu slobodno kretati u organskim otapalima, dok su u prirodnim sustavima fiksni na svojim položajima te to može promijeniti njihovo ponašanje. Kako bi se istraživanjima približilo što više uvjetima u prirodnim sustavima, provedena su elektrokemijska mjerenja u micelarnim sustavima u kojima se karotenoidi mogu smjestiti na uređen način, tj. međufaza hidrofilnog i hidrofobnog dijela može biti jednostavan model za proučavanje procesa koji se javljaju kod bioloških membrana.²¹¹ Karotenoidi se u prirodnim sustavima obično nalaze u hidrofobnom dijelu. Međutim, njihove terminalne polarne skupine mogu se protezati izvan hidrofobnog dijela kako bi bile u dodiru s vodom, što može utjecati na sama svojstva karotenoida. Budući da su karotenoidi netopljivi samo u vodi, određena mjerenja su provedena u smjesi otapala vode i organskog otapala koje se može s njome miješati i koji može otopiti karotenoide.²¹² Također su provedena mjerenja karotenoida u obliku samostalnih monoslojeva koji omogućavaju ispitivanje karotenoida u izravnom dodiru s vodenom fazom.^{210, 214} Takvi su uvjeti bliže prirodnom okruženju karotenoida u živoj stanici. Međutim, veza u obliku tiolnih grupa ili nekog derivata karotenoida bila je neophodna za provedbu ovakvih mjerenja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Kapsaicin ($\geq 95\%$, iz vrste *Capsicum* sp.), β -karoten ($\geq 95\%$), indigo (95%), β -ciklodekstrin ($\geq 97\%$) i sepiolit kupljeni su od proizvođača Sigma, Njemačka. Astaksantin i lutein (analitičke čistoće) nabavljeni su od Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd, Kina koji su velikodušno ustupili određenu količinu uzoraka. Kalijev nitrat (KNO_3) i puferske otopine pH-vrijednosti 2,0-11,0 kupljene su od Kemike, Hrvatska te su bile analitičke čistoće. Perklorna kiselina (HClO_4), aceton (p.a.), etanol (p.a., 96%) i dimetilsulfoksid (DMSO, p.a.) su također kupljeni od Kemike, Hrvatska. Kalcijev karbonat (CaCO_3) nabavljen je od kompanije Merck (suprapur). Voda je deionizirana pomoću sustava Millipore Milli-Q na otpornost otopine od $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Prilikom korištenja $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, otopina je korigirana na određenu pH-vrijednost.

3.2. Uzorci paprika, riba i ljuskara

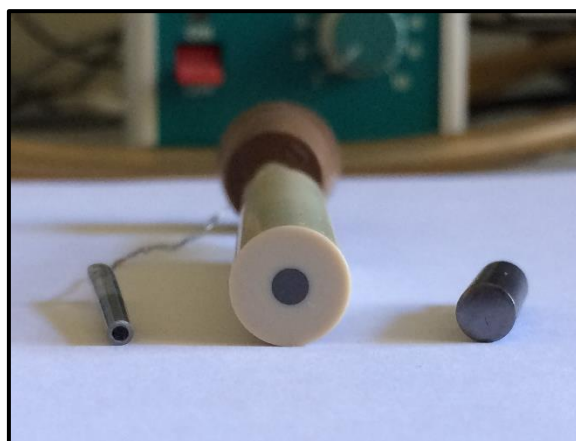
Za provedbu istraživanja kapsaicinoida u uzorcima čili paprika, kupljeno je devet čili paprika (Bhut Jolokia, Red Savina, Fatalli, Habanero Orange, Carolina Cayenne, Cayenne, Jalapeno, Ancho i slatka mađarska paprika) različite ljutine u lokalnim dućanima u Zagrebu. Proizvođači su navedeni u fusnoti tablice 4.1. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi do provedbe analize te su analizirani u izvornom obliku.

Uzorci riba i ljuskara kupljeni su na tržnici Dolac, Zagreb od različitih dobavljača. Svi uzorci su očišćeni te su uklonjeni unutrašnji organi. Meso riba i rakova je otkoštено, izvagano, homogenizirano sa $200 \mu\text{L}$ destilirane vode u homogenu smjesu te smrznuto do analize. Ljuštura kozica izvagana je te sušena do konstantne mase. Zatim je usitnjena u tarioniku i skladištena u zamrzivaču do analize. Također, kod kozice su uzeta dva različita dijela mesa, poprečni presjek te vanjski sloj ispod ljuštore kako bi se vidjelo u kojem dijelu se skladišti najveća koncentracija karotenoida.

3.3. Metode

3.3.1. Elektrokemijske metode

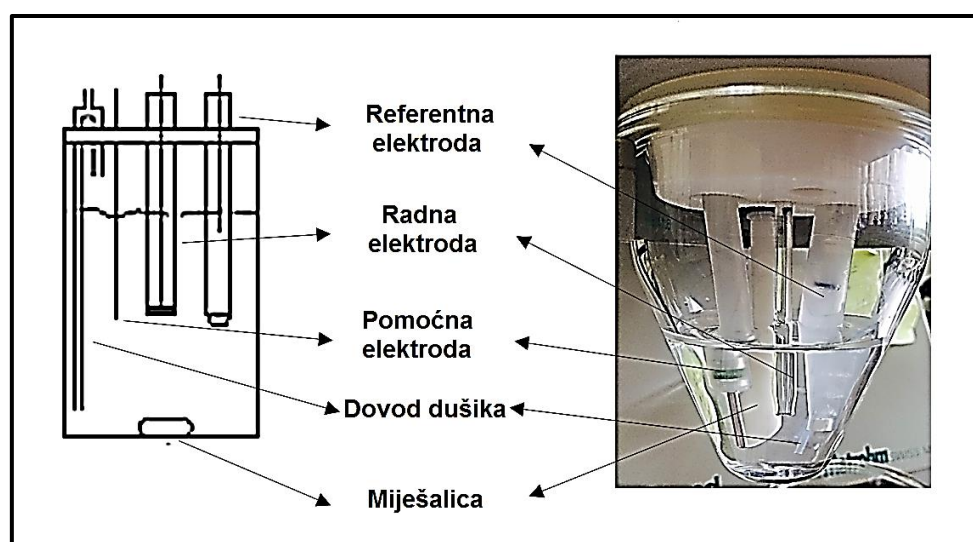
Voltametrijska mjerenja provedena su pomoću kompjutorski kontroliranog elektrokemijskog sustava Autolab PGSTAT 30 (Eco-Chemie, Utrecht, Nizozemska). Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi, a otopine su zasićene dušikom barem 20 minuta prije provedbe svih elektrokemijskih mjerenja. Prilikom provedbe eksperimenata s karotenoidima, ćelija je zaštićena od svjetla aluminijskom folijom. Svako elektrokemijsko mjerenje ponovljeno je šest puta.



Slika 3.1. Fotografija tri elektrode korištene u radu. S lijeva na desno: miniaturizirana elektroda od grafitne paste (mCPE), elektroda od staklastog ugljika (GCE) i parafinom impregnirana grafitna elektroda (PIGE).

Korišten je troelektroдни sustav koji se sastoji od radne, referentne i pomoćne elektrode. Razlika potencijala radne i referentne elektrode mijenja se s vremenom, a mjeri se struja koja protječe između radne i pomoćne elektrode. Pomoćna elektroda u ovom istraživanju bila je žica platine, a referentna elektroda je bila Ag/AgCl (3 M KCl) elektroda. Radna elektroda može biti izrađena od raznih materijala, a u ovom istraživanju su se koristile parafinom impregnirana grafitna elektroda, elektroda od staklastog ugljika te ručno izrađena elektroda od ugljikove paste. One su prikazane na slici 3.1. Parafinom impregnirana grafitna elektroda (PIGE) (promjera 5 mm, dužine 50 mm) dobivena je od profesora Fritza Scholza sa Sveučilišta Ernst Moritz Arndt u Greifswaldu, dok je elektroda od staklastog ugljika (GCE) kupljena od tvornice BASi, Amerika.

PIGE je prije svakog mjerenja mehanički očišćena. Cirkularna površina elektrode je oprana etanolom i destiliranom vodom, osušena i polirana te ponovno oprana, osušena i polirana, prvo na grubljem papiru gradacije P150, zatim na finijem papiru gradacije P1200 te na kraju na suhom i čistom bijelom papiru. Čistoća elektrode je provjeravana prije svakog mjerenja snimanjem odziva osnovnog elektrolita. Nakon toga se pristupilo modifikaciji parafinom impregnirane grafitne elektrode. Elektroda od staklastog ugljika čistila se pomoću dijamantnog spreja (Kemet, Velika Britanija) koji se nanese na filter papir te se na njemu polira površina elektrode. Nakon toga elektroda je isprana etanolom i vodom, posušena papirom i bila je spremna za korištenje. Ovi koraci ponavljani su prije svakog mjerenja.



Slika 3.2. Elektrokemijska ćelija koja se koristi u voltametriji.

Mjerenja su provedena i na minijaturiziranoj elektrodi od grafitne paste (mCPE) koja je izrađena u laboratoriju. Ukratko, nastavak za pipetu ukupnog volumena 5 μL izrezan je do promjera $d = 0,1$ mm. Donji dio otvora zamotan je parafilmom. Usitnjeni grafitni prah je izvagan te prebačen u tarionik. Na grafit je dodan odgovarajući volumen parafinskog ulja tako da omjer grafita i parafinskog ulja bude 3:1 (w/w). Zatim je smjesa homogenizirana u tarioniku do nastanka grafitne paste. Pripremljeni pipetni nastavak punjen je navedenom smjesom koja je periodički sabijana u kalup. Nakon što je kalup napunjen, metalna spajalica za papir raširena je u ravnu žicu te je uronjena i učvršćena u grafitnu pastu u kalupu kako bi se osigurao električni kontakt. Sa dna sad već izrađene elektrode od grafitne paste, maknut je parafilm te je elektroda polirana na finijem papiru gradacije P1200 i na kraju na suhom i čistom bijelom papiru te je

isprana Mili-Q vodom. Vrhom elektrode prošlo se dva-tri puta kroz plamen kako bi se plastika kalupa stisnula uz grafitnu pastu kako ne bi došlo do prodiranja otopljenog uzorka uz unutarnje stjenke kalupa. Zatim je ponovljen postupak poliranja. Elektroda je uronjena u vodenu otopinu elektrolita te je provedena ciklička voltametrija u 10 uzastopnih skenova u rasponu potencijala od -0,6 V do 1,2 V s brzinom promjene potencijala od 0,1 V s⁻¹ kako bi se postigla stabilnost površine novoformirane elektrode. Ovakva elektroda spremna je za korištenje.

Tipičan izgled elektrokemijske ćelije korištene u istraživanju prikazan je na slici 3.2. Uz radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu, u ćeliji se nalaze i cjevčica za dovod dušika pomoću koje se uklanja otopljeni kisik te miješalica.¹⁸⁰

U analizi kapsaicinoida i realnih uzoraka čili paprika koristio se uobičajeni elektrolit, kalijev nitrat (KNO₃) koncentracije 0.1 mol dm⁻³ u rasponu potencijala od -1.0 do +1.0 V. Ovisnost elektrokemijskog odziva o pH-vrijednosti ispitivana je u rasponu između 2,0 i 11,0 pomoću pravokutnovalne voltametrije. Istraživanja na modificiranoj PIGE provedena su pri koraku potencijala od 2 mV i pravokutnovalnoj amplitudi od 50 mV. Ispitivana je promjena frekvencije u rasponu od 8 do 300 Hz. Eksperimenti pomoću cikličke voltametrije provedeni su pri pH 11,0 s varirajućom brzinom promjene potencijala između 5 i 300 mV s⁻¹. Uzorci čili paprika analizirani su pomoću pravokutnovalne voltametrije pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima: koraku potencijala od 2 mV, pravokutnovalnoj amplitudi od 50 mV, pravokutnovalnoj frekvenciji od 150 Hz i pH-vrijednosti 11,0. Mjerenja su ponovljena šest puta.

Analiza karotenoida bila je nešto složenija jer do provedbe ovih istraživanja nisu pronađeni literaturni podaci o elektrokemijskom ponašanju karotenoida u vodenom mediju. Zbog toga je analiza provedena u dva različita elektrolita (kalijevom nitratu (KNO₃) i perklornoj kiselini (HClO₄)). Mjerenja su provedena pri sličnim uvjetima kao za kapsaicinoide. Provedene su pravokutnovalna i ciklička voltametrija na PIGE elektrodi. Eksperimentalni uvjeti uključivali su korak potencijala od 2 mV, amplitudu od 50 mV, dok je frekvencija mijenjana od 10 do 1000 Hz. Mjerenja pomoću cikličke voltametrije provedena su s promjenjivom brzinom promjene potencijala između 10 i 1000 mV s⁻¹.

Za obje vrste antioksidativnih uzoraka, radne otopine u elektrokemijskoj ćeliji su propuhane dušikom, odnosno uklonjen je kisik pomoću dušika visoke čistoće prije provedbe mjerenja.

Voltametrijske tehnike koju se korištene u svim mjerenjima bile su ciklička (CV) i pravokutnovalna (SWV) voltametrija te su primijenjene na sljedeće metode:

1. Voltametrija imobiliziranih mikrokristala,
2. Voltametrija imobiliziranog mikrofilma i
3. Voltametrija imobilizirane kapi.

3.3.1.1. Voltametrija imobiliziranih mikrokristala

Kako bi se pripremila modificirana PIGE, alikvoti od 2 mg usitnjenog praha standarda/čili paprike stavljeni su na porculansku pločicu kako bi se ravnomjerno rasporedili. Kruti uzorci su zatim abrazivno, kružnim pokretima, preneseni na prethodno zagrebanu površinu PIGE. Modificirana PIGE je uronjena u elektrolit samo tijekom voltametrijskih mjerenja, a uronjeno je manje od 1 mm grafitnog štapića. Ovom tehnikom analizirani su svi uzorci u ovoj disertaciji, dakle i standardi kapsaicin, β -karoten, astaksantin i lutein te svi realni uzorci.

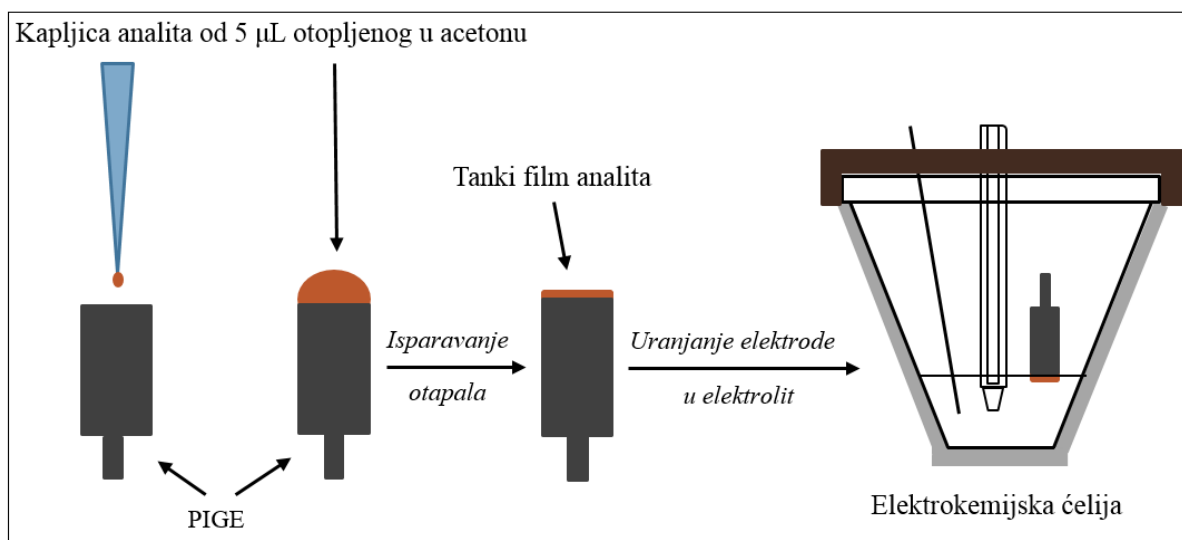
Metoda standardnog dodatka

Za kvantitativno određivanje kapsaicinoida u krutim uzorcima čili paprika, primijenjena je metoda standardnog dodatka koju su ranije opisali i koristili znanstvenici predvođeni A. Doménech-Carbó.²¹⁴ Metoda se bazira na formiranju homogene smjese koja se sastoji od poznate količine čili paprike (m_{smjese}) koja sadrži nepoznatu masu, m_X analita X (kapsaicin) i mase m_R od referentne komponente R (indigo) te je u nju postepeno dodana poznata količina standarda (standard kapsaicin), m_X^* . Dobivena kalibracijska krivulja rezultat je odnosa omjera struja odziva nastalih elektrokemijskom oksidacijom uzoraka čili paprika i indiga [$I_p(X)/I_p(R)$] prema omjeru masenih udjela standarda i indiga (referentne komponente), m_X^*/m_R : $\Delta I_p(X)/\Delta I_p(R) = K m_X^*/m_R + K(m/m_R)(m_X/m)$. Nagib K dobivene linearne ovisnosti jednak je omjeru amperometrijskih konstanti kapsaicina i indiga. Maseni udio kapsaicina u uzorcima čili paprika (m_X/m) procijenjen je iz ordinate kad je apscisa jednaka nuli. Omjer m/m_R je konstantan i poznat i jednak je $m/m_R = 15 \text{ mg}/30 \text{ mg}$. Stoga, maseni udio kapsaicina u uzorcima čili paprika procijenjen je iz odsječka koji je pomnožen sa dva i podijeljen sa nagibom. Kalibracija je provedena dodavanjem sve većih količina standarda kapsaicina u smjesu indigo + čili paprika + sepiolit (1:0,5:1). Za izradu kalibracijskih krivulja korišteno je minimalno pet kalibracijskih mjerenja.

Sama priprema uzoraka je relativno jednostavna, odnosno 15 mg usitnjene čili paprike, 30 mg indiga i 30 mg sepiolita pravilno su vagani te ručno izmiješani u tarioniku do nastanka homogene smjese i zatim stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta. Nakon toga, u dobivenu smjesu dodane su različite količine standarda kapsaicina te su smjese ponovno homogenizirane, stavljene u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta i ponovno homogenizirane u tarioniku kako bi se dobila ravnomjerno distribuirana smjesa. Površina PIGE je zatim modificirana mikrokristalima ovih uzoraka na prethodno opisan način.

3.3.1.2. Voltimetrija imobiliziranog mikrofilma

U tehnici voltimetrije imobiliziranog mikrofilma (eng. *stripping voltammetry microprobe (SPV)*) cilj je napraviti tanki film analita na površini elektode koristeći što manji volumen.²¹⁵ Ova tehnika primijenjena je na standarde kapsaicinoida i karotenoida te na realne uzorke (čili paprike, morski organizmi). Shematski prikaz ove metode prikazan je na slici 3.3., a bazira se na pipetiranju 5 μL (ili manje) otopine analita otopljenog u odgovarajućem lako hlapivom otapalu koje isparava na zraku u par sekundi. Precipitat se tada analizira pomoću cikličke i pravokutnovalne voltimetrije pri različitim eksperimentalnim uvjetima.

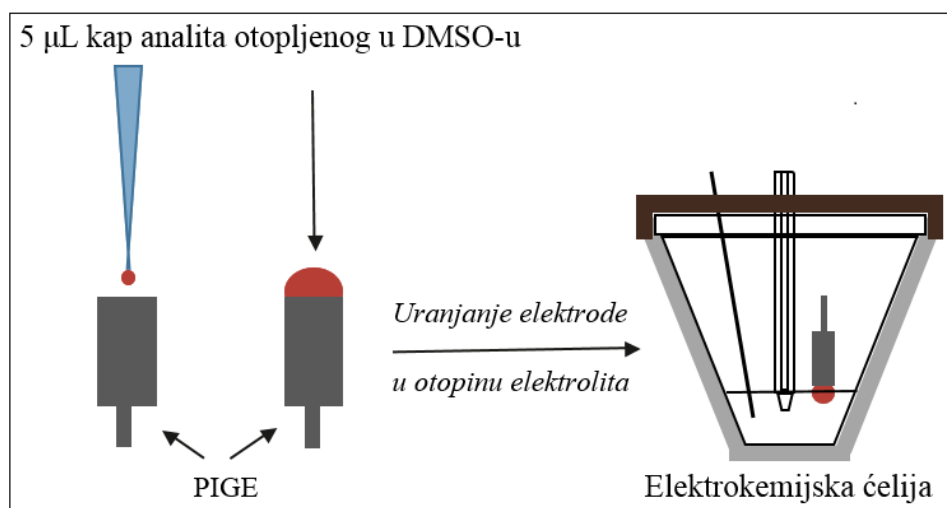


Slika 3.3. Shematski prikaz tehnike imobiliziranog mikrofilma.

Ispitivale su se različite koncentracije standarda ovisno o topljivosti u organskom otapalu. Standard kapsaicin je otopljen u etanolu pri različitim koncentracijama (0,05, 0,07, 0,1, 0,3, 0,4, 0,5 i 1 g dm⁻³), dok su karotenoidi otopljeni u acetonu zbog bolje topljivosti prema literaturi i ispitane su različite koncentracije. Maksimalna topljivost β -karotena u acetonu 200 mg dm⁻³, dok za lutein i astaksantin iznosi 800 mg dm⁻³.⁹⁶ Realni uzorci su prije mjerenja podvrgnuti postupku ekstrakcije koja je opisana dalje u tekstu.

3.3.1.3. Voltametrij a imobilizirane kapi

Tehnika imobilizirane kapi bazira se na trofaznom sustavu. Elektrokemijske reakcije koje su ograničene na sustave s tri faze zanimljive su jer obuhvaćaju reakcije prijenosa elektrona i iona.²¹⁶ Standardi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u različitim koncentracijama, a određivanju u uzorcima morskih organizama prethodila je ekstrakcija u DMSO. Ekstrakt se onda primjenjivao kao jedna od faza sustava. Na slici 3.4. shematski je prikazana ova tehnika. Volumen od 5 μ L analita koji je otopljen u DMSO-u nanese se na površinu elektrode. Privlačne sile između površine elektrode i viskoznog dimetil sulfoksida omogućuje uranjanje elektrode u vodenu otopinu elektrolita, odnosno stvara se kontakt između kapi analita i vodenog elektrolita te se zatim pristupa elektrokemijskom mjerenju. Kao radna elektroda koristila se PIGE, a tehnika je primijenjena na uzorke karotenoida i morske organizme.



Slika 3.4. Shematski prikaz tehnike imobilizirane kapi.

3.3.2. Spektrofotometrija

Spektrofotometrijska analiza provedena je za karotenoide i uzorke morskih organizama na spektrofotometru Infinite M200 PRO plate reader. Uzorci su pripremljeni na isti način kao za prethodno opisane metode te su pipetirani u jažice po 100 μL . S obzirom da karotenoidi apsorbiraju između valnih duljina od 450 do 500 nm, mjerenja su provedena u tom valnom području. Također su mjerene apsorbancije pri određenim valnim duljinama za pojedine karotenoide: β -karoten pri 452 nm, lutein pri 456 i 484 nm te astaksantin pri 480 nm. Za svaki karotenoid ispitane su različite koncentracije i izrađeni su baždarni pravci. Realni uzorci morskih organizama ispitivani su na isti način.

3.3.3. Ekstrakcija

3.3.3.1. Ekstrakcija kapsaicinoida iz uzoraka čili paprika

Ekstrakcija kapsaicinoida iz uzoraka čili paprika u ovom je radu potpomognuta ultrazvučnim valovima te je provedena prema metodi iz literature²¹⁷ uz manje promjene. Vagano je oko 200 mg uzorka čili paprike te je dodano 12,5 mL etanola. Uzorci su zatim stavljeni u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex SweepTec®) te je provedena ekstrakcija tijekom 20 minuta pri temperaturi od 50°C za sve čili paprike navedene u tablici 4.1. Ekstrakcija kapsaicinoida iz čili paprike Bhut Jolokie prethodno je provedena pri istim eksperimentalnim uvjetima, međutim s dužim periodom trajanja ekstrakcije, od 120 minuta. Dodatne otopine različitih koncentracija pripremljene su pipetiranjem odgovarajućeg volumena originalnog ekstrakta i razrjeđivanjem sa etanolom (pripremljene koncentracije su bile: 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 g dm⁻³).

3.3.3.2. Ekstrakcija karotenoida iz morskih organizama

Za ekstrakciju karotenoida, korištene su dvije metode preuzete iz literature s obzirom da postoji više načina ekstrakcije spomenutih spojeva. Postupci ekstrakcije preuzeti su iz literature, modificirani su, označeni u daljnjem tekstu kao metoda 1²¹⁸, metoda 2 i metoda 3²¹⁹ te su prilagođene ispitivanim uzorcima. Uzorci su vagani i njihove odvage za obje metode navedene su u tablici 3.1. Primjenom metode 1, odvage homogeniziranih uzoraka stavljene su u tube od 10 mL. Na odvagu je dodano 5 mL dimetilsulfoksida (DMSO, p.a.). Tube su zatvorene i

stavljene u vodenu kupelj koja je prethodno zagrijana na 50°C. Uzorci su inkubirani 30 minuta, s time da su svakih 10 minuta homogenizirani 15 sekundi na tresilici (Innova 42 incubator shaker (New Brunswick)). Nakon pola sata, uzorci su centrifugirani 5 minuta na centrifugi Centrifuge 5804R (Eppendorf) (4000 okretaja po minuti). Supernatant je sakupljen u novu, odmjernu tikvicu (25 mL). Na preostali talog dodano je 5 mL acetona (Kemika, p.a.) te je smjesa homogenizirana 30 sekundi. Uzorci su ponovno centrifugirani pri istim uvjetima kao što je ranije navedeno te je supernatant prenesen u odmjernu tikvicu. Ovaj postupak je ponavlján do potpunog obezbojenja supernatanta te je zatim odmjerna tikvica nadopunjena acetonom do oznake i stavljena u zamrzivač do daljnje analize.

Tablica 3.1. Odvage homogeniziranog mesa različitih vrsta riba i rakova.

Vrsta uzorka	Odvaga / g		
	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3
Losos	1,4524	1,4718	1,6969
Brancin	1,4908	1,6298	1,7220
Kozica ljuštura* poprečni presjek vanjski sloj*	2,5281	-	-
	1,0070	1,5280	1,7277
	1,0242	-	-
Škamp	1,0520	1,4533	1,8145
Trlja	1,6823	1,5971	1,9650
Kokot	2,8329	2,3024	1,6848
Pastrva* obična kalifornijska	-	1,9662	-
	-	1,9252	-

*mjerenje provedeno naknadno samo Metodom 2.

Metoda 2 je po svemu jednaka metodi 1, međutim nakon što je provedena ekstrakcija s acetonom do obezbojenja, uzorak je uparen (Nitrogen Evaporator, N-EVAPTM111, Organomation Associates Inc., Berlin, MA 01503 USA) u atmosferi dušika dok nije zaostao

samo ekstrakt otopljen u DMSO-u. Na taj način omogućilo se određivanje ekstrahiranih karotenoida iz uzoraka morskih organizama pomoću voltametrije imobilizirane mikrokapi.

Metodom 3 uzorci su prvo isprani tri puta sa 5 mL acetona s time da je između svakog dodatka acetona, uzorak stavljen u vodenu kupelj (50°C) na 5 minuta. Supernatant je odvojen centrifugiranjem pri 4000 okretaja po minuti (Centrifuge 5804R (Eppendorf)). Supernatant je prikupljen, a na talog je dodano novih 5 mL acetona. Postupak je ponovljen tri puta, a zatim je na prikupljeni ekstrakt dodano 5 mL heksana, 20 mL Mili-Q vode te 0,1 g soli natrijeva klorida (NaCl). Ovakva smjesa stavljena je u mrak na tresilicu (Innova 42 incubator shaker (New Brunswick)) 20 minuta. Došlo je do razdvajanja slojeva te je gornji sloj koji sadrži karotenoide otopljene u heksanu odvojen i uparen u atmosferi dušika do suhog. Nakon toga je na uzorak dodan 1 mL acetona te su uzorci zamrznuti do daljnje analize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4. REZULTATI I RASPRAVA

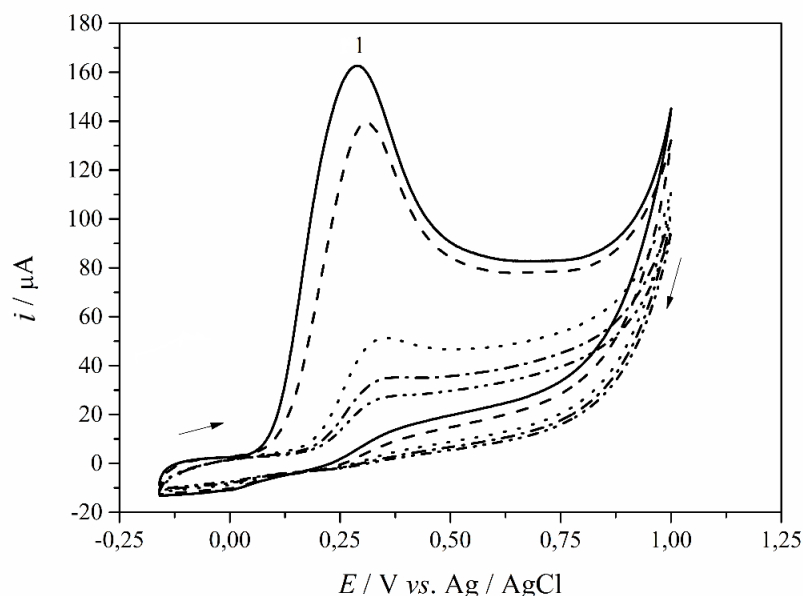
4.1. Elektrokemijska karakterizacija kapsaicinoida

S obzirom na sve veću potražnju za ljutim čili paprikama u mnogim industrijskim granama, određivanje ukupne količina kapsaicinoida odgovornih za njihovu ljutinu postaje sve važniji zadatak. Uz još uvijek korištenu, najstariju metodu, Scoville-ov organoleptički test²²⁰, danas su često korištene kromatografske tehnike (GC, HPLC te tankoslojna kromatografija) kao i spektrofotometrijske metode. No sa ekonomskog stajališta, ove tehnike ne pružaju mogućnost rutinske analize kapsaicinoida u uzorcima, stoga se traže alternativne tehnike.

U ovome radu, voltametrijsko ponašanje kapsaicina ispitivano je primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije na imobiliziranim mikrokristalima te imobiliziranom mikrofilmu. Predložen je reakcijski mehanizam oksidacije kapsaicinoida, a pomoću metode standardnog dodatka primijenjene na voltametriju imobiliziranih mikrokristala, uspješno je određena količina ukupnih kapsaicinoida u uzorcima ljutih čili paprika.

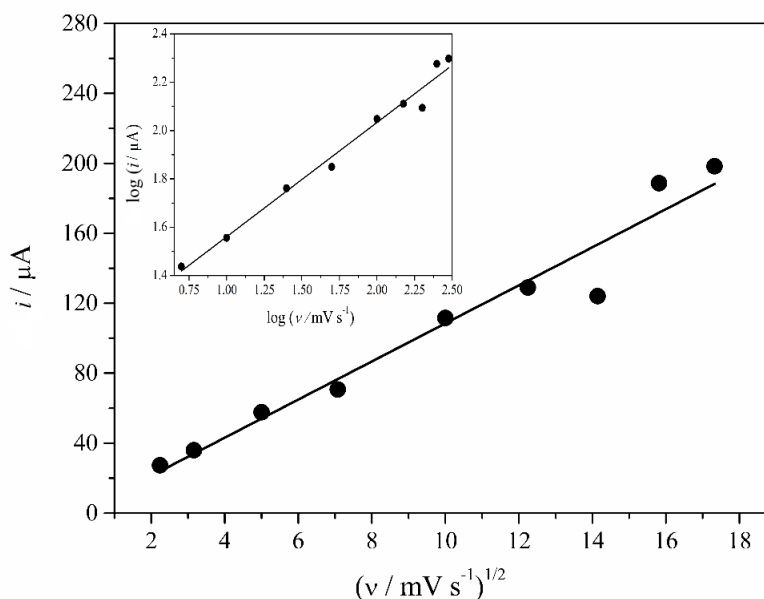
4.1.1. Voltametrija imobiliziranih mikrokristala kapsaicina

Ciklički voltamogrami kapsaicina snimljeni su u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kalijevom nitratu (KNO_3) kao elektrolitu pri pH 11 u rasponu potencijala od $-0,16 \text{ V}$ do $1,0 \text{ V}$. Slika 4.1. prikazuje uzastopne cikličke voltamograme oksidacije mikrokristala kapsaicina. Može se vidjeti jedan dobro definiran anodni, oksidacijski val (1) pri $0,276 \text{ V}$, no nema vidljivog katodnog vala na povratnoj komponenti struje što upućuje da je elektrodna reakcija potpuno ireverzibilna (slika 4.1., 1. ciklus) Uzastopnim snimanjem cikličkih voltamograma na istoj elektrodi modificiranoj kapsaicinom nije došlo do promjene potencijala vala 1, no došlo je do smanjenja odziva vršne struje (slika 4.1.). Također, na uzastopnim cikličkim voltamogramima nije došlo do nastanka novih odziva osim odziva vala 1. Praćen je i učinak brzine promjene potencijala na oksidaciju kapsaicina u području od 5 do 300 mV s^{-1} . Vršne struje vala 1 kapsaicina pokazale su linearnu ovisnost o korijenu brzine promjene potencijala, a prikazivanjem ovisnosti logaritma dobivenih vršnih struja vala 1 kapsaicina prema logaritmu brzine promjene potencijala dobivena je linearna ovisnost s nagibom od $0,47$ (slika 4.2.). Vrijednosti vršnih potencijala vala 1 ne ovise o brzini promjene potencijala.



Slika 4.1. Uzastopni ciklički voltamogrami mikrokristala kapsaicina imobiliziranih na površinu PIGE i uronjenih u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11: 1. (—), 2. (---), 3. (···), 4. (-·-) i 5. (-·-·-) sken. Ostali eksperimentalni uvjeti su: $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_f = 1,0 \text{ V}$, $v = 150 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$.

Pravokutnovalni voltamogrami mikrokristala kapsaicina snimljeni pri dvije različite pH-vrijednosti prikazani su na slici 4.3. U jako lužnatom mediju (pH = 11,0), SWV odziv kapsaicina sastoji se od jednog dobro definiranog vala 1 (slika 4.3. A). Pri nižim pH-vrijednostima, pravokutnovalni voltamogrami pokazuju dva anodna odziva: jedan dobro definiran val 1 i novi val 2 pri pozitivnijem potencijalu (slika 4.3. B). Ova se dva vala spajaju u jedan široki val pri pH 6,0, a u elektrolitima s pH-vrijednosti ispod 6,0 izražen je jedan oštar val koji odgovara glavnom oksidacijskom procesu (1) prikazanom na slici 4.7. Oksidacijski val 2 je slabo izražen i daljnje analize nisu provedene. Ukupna struja za val 1 se smanjuje s povećanjem pH, do pH-vrijednosti 6,0, a nakon toga se povećava i dostiže maksimum pri pH 11,0 (slika 4.4.). Ovakav trend je sličan rezultatima u literaturi gdje su istraživanja provedena na grafitnoj elektrodi u obliku olovke, a maksimum odziva vršne struje postignut je pri pH-vrijednosti 9,0.¹⁹⁷



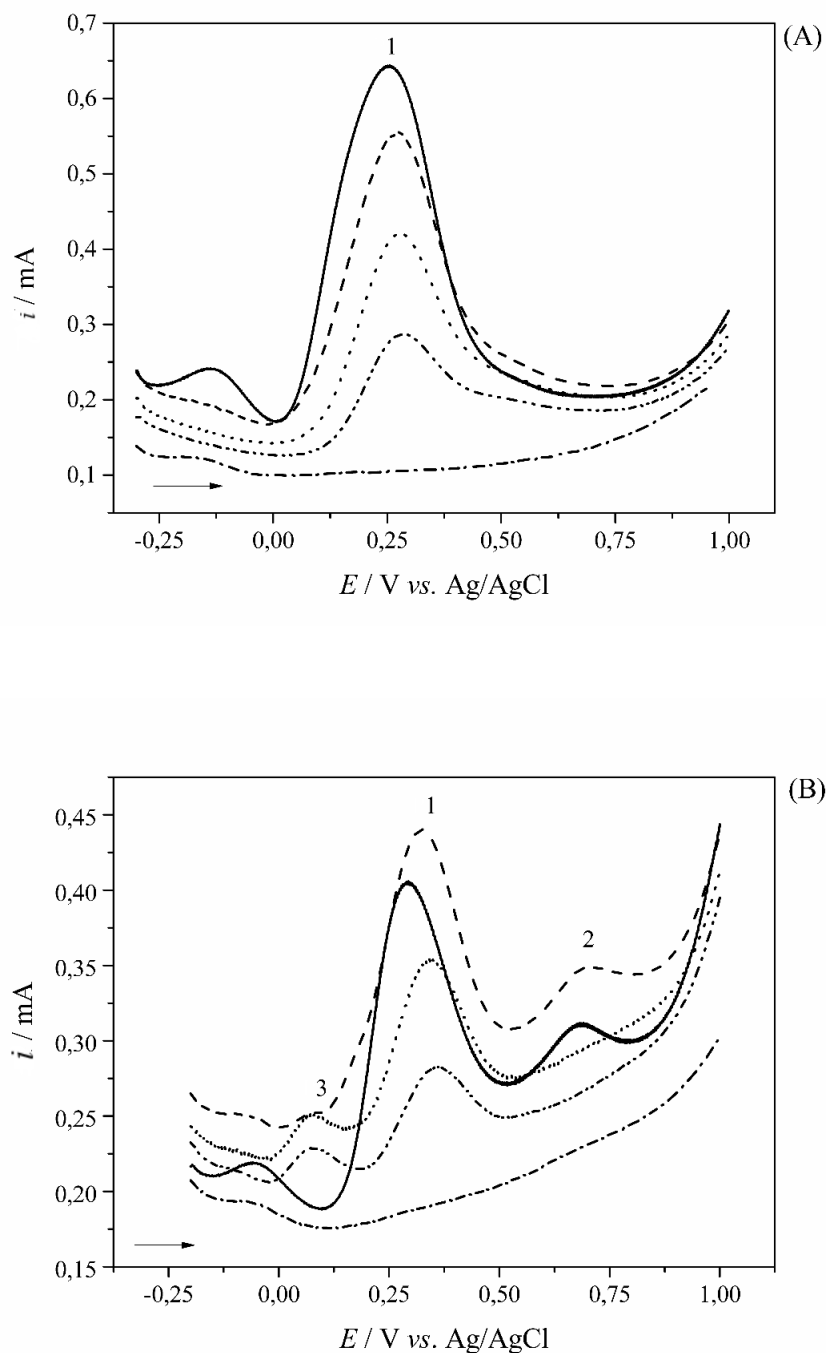
Slika 4.2. Ovisnost vršnih struja vala 1 kapsaicina u obliku mikrokristala o drugom korijenu brzine promjene potencijala pri pH 11. Umetak na slici: ovisnost $\log(i)$ vs. $\log(v)$. Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.1.

Nasuprot tome, na MWCNT-BPPG i elektrodama od ugljikove paste modificirane mezoporoznim silicijevim dioksidom obogaćenim amino-skupinama (engl. *carbon paste electrode modified with amino-functionalized mesoporous silica*, NH₂-FMS/CPE), odziv vršne struje za kapsaicin pada pri višim pH-vrijednostima.^{196, 199} Ove razlike se mogu objasniti učincima različitih materijala od kojih su elektrode napravljene što posljedično utječe na samu redoks reakciju.

Vršni potencijal prvog vala (1) linearna je funkcija pH-vrijednosti u rasponu od 2,0 do 10,0 (slika 4.4.) te se može izraziti jednadžbom:

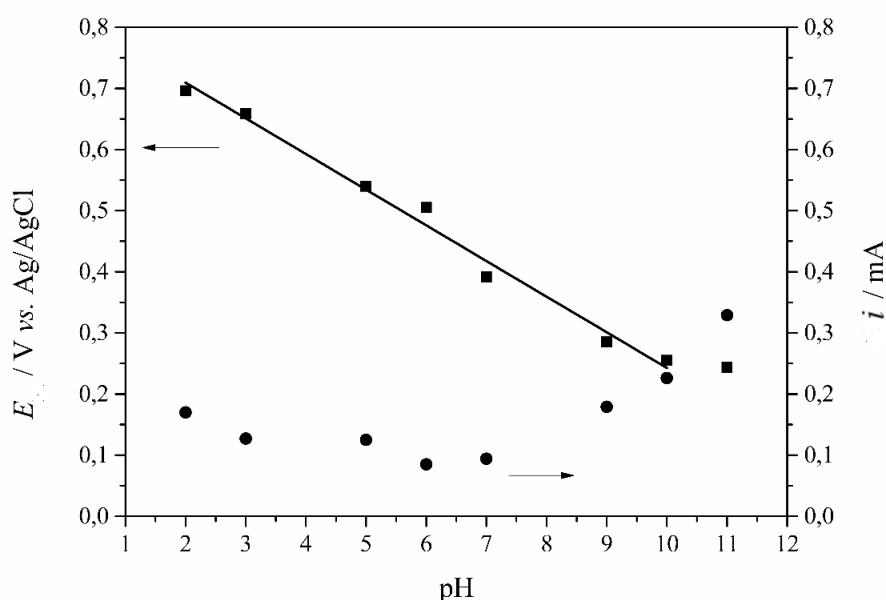
$$E_{p,1}(V) = 0,826 - 0,058 \cdot \text{pH},$$

Nagib od -58 mV/pH jako je blizu teoretskoj vrijednosti za redoks procese koji uključuju jednak broj elektrona i protona. Iznad pH 10,0, potencijal vala 1 neovisan je o pH-vrijednosti što sugerira da atomi vodika više ne sudjeluju u elektrodnoj reakciji. Promjena kod pH-vrijednosti 10,0 odgovara pK_a vrijednosti kapsaicina ($pK_a = 9,98^{221}$) i može se objasniti gubitkom protona s hidroksilne grupe u benzenskom prstenu molekule kapsaicina.



Slika 4.3. Uzastopna pravokutnovalna voltametrija mikrokristala kapsaicina u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ KNO_3 pri pH 11 (A) i pH 9 (B). Prikazani su 1. (—), 2. (---), 3. (···), 4. (-·-) sken i SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti: $f=100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2 i 3 te ukupni SWV odziv (Δi).

Uzastopna SWV analiza pružila je dodatne informacije o reakcijama koje se dešavaju na PIGE. Ukoliko je $\text{pH} < 11,0$, novi reverzibilni val 3 se javlja u drugom uzastopnom skenu pri potencijalima nižim od potencijala kod kojeg se zbiva glavni oksidacijski proces (slika 4.3. B). Ukupni vršni potencijal vala 3 je 0,080 V, dok su vršni potencijali početne (oksidacijske) i povratne (redukcijske) komponente jednaki 0,078 V i 0,068 V. Ukupna vršna struja vala 3 značajno se povećava u trećem uzastopnom skenu i zatim ostaje gotovo konstantna sa svakim slijedećim uzastopnim skenom. Ovo upućuje da je na površini elektrode uspostavljeno reverzibilno stabilno stanje. Ovakvi rezultati slažu se s literaturnim rezultatima^{196, 223} i upućuju na to da odziv vala 3 odgovara reverzibilnoj redoks reakciji produkta oksidacije kapsaicina na površini PIGE.



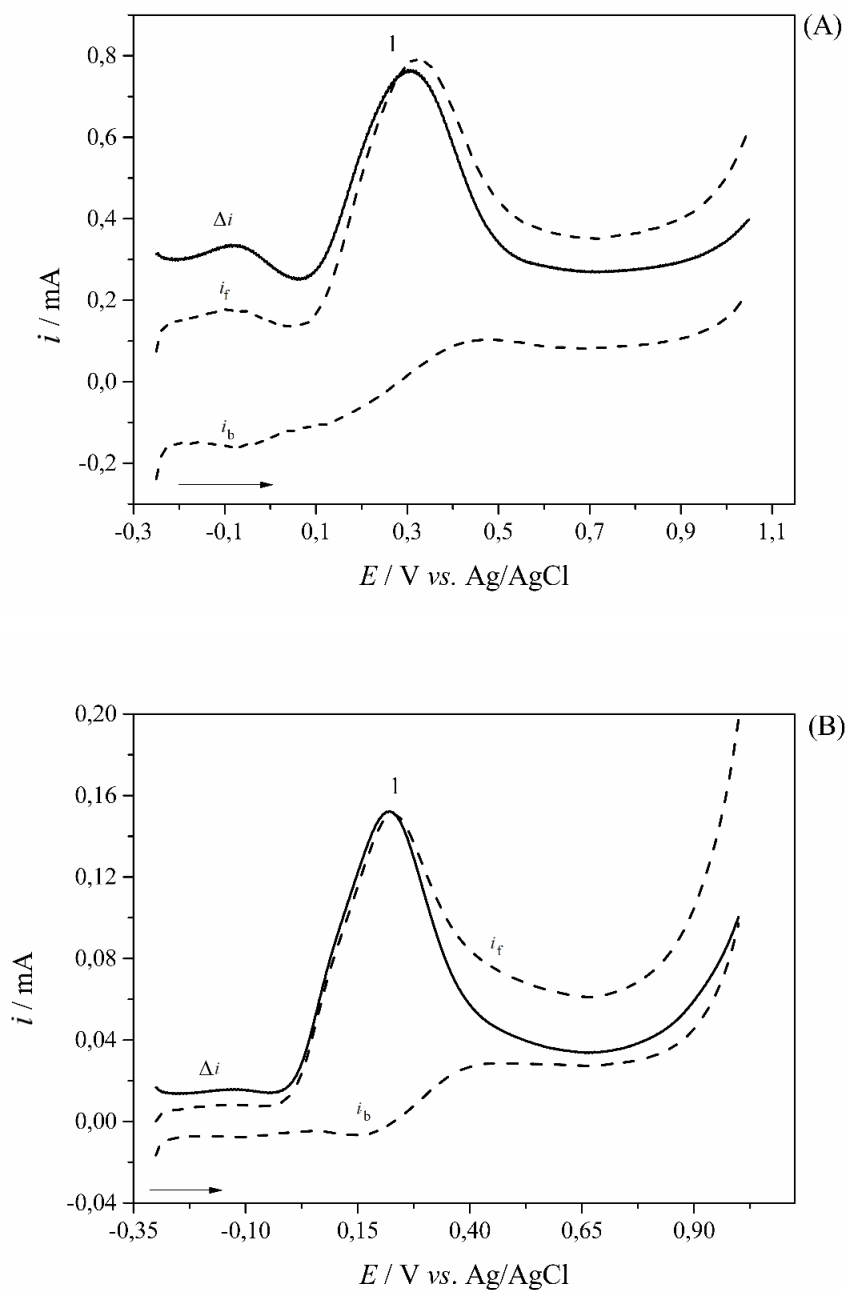
Slika 4.4. Ovisnost vršnih potencijala (■) te vršnih struja (●) za val 1 dobivenih pravokutnovalnom voltametrijom mikrokristala kapsaicina o pH-vrijednosti otopine. Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.3.

Ponavljanjem uzastopnih skenova, dolazi do pomaka vršnih potencijala vala 1 i vala 2, koji se javljaju u prvom skenu, prema pozitivnijim vrijednostima te dolazi do smanjenja vršnih struja. Ovo upućuje na to da je površina elektrode brzo blokirana zbog jake adsorpcije produkta oksidacije mikrokristala kapsaicina nastalog u elektrodnoj reakciji. U uzastopnim SWV

odzivima mjerenim u elektrolitnoj otopini pri pH 11,0, nije uočen odziv vala 3 (slika 4.3. A). Nadalje, nije došlo do promjene vršnog potencijala vala 1, no jakost struje se postepeno smanjuje sa svakim novim uzastopno snimljenim voltamogramom. Isti trend je primijećen kod uzastopnih CV eksperimenata provedenih kod pH 11,0. Ovakvi rezultati pokazuju da u jako lužnatom mediju (pH 11,0) u elektrodnoj reakciji sudjeluju i najmanje i najreaktivnije čestice kapsaicina te se produkt nastao oksidacijom kapsaicina otapa u elektrolitnoj otopini.²²³ Otapanje produkta elektrodne reakcije objašnjava izostanak vala 3. Slika 4.5. prikazuje pravokutnovalne voltamograme mikrokristala kapsaicina snimljene pri dvjema različitim frekvencijama pri pH 11,0. Ako je frekvencija jednaka 150 Hz, SWV odgovor se sastoji od vala 1 pri 0,256 V (slika 4.5. A). Početna i povratna komponenta vršne struje ukazuju da se radi o totalno ireverzibilnoj oksidaciji. Međutim, mjerenjem pri nižim frekvencijama (8-50 Hz) može se primijetiti slabo definiran val na povratnoj komponenti struje. Kad je $f = 8$ Hz, maksimum početne komponente struje i minimum odgovarajuće povratne komponente struje pojavljuju se pri $E_f = 0,222$ V te $E_b = 0,191$ V (slika 4.5. B). Dolazi i do pomaka ukupnih vršnih potencijala prema pozitivnijim vrijednostima s povećanjem frekvencije što je u slaganju s teorijom kinetički kontrolirane elektrodne reakcije.¹⁶⁰

Utjecaji frekvencije na ukupnu vršnu struju i vršni potencijal vala 1 za SWV mjerenje kapsaicina prikazani su na slici 4.6. Ovisnost ukupnog potencijala vala 1 i logaritma SWV frekvencije prikazana je s dva različita linearna segmenta drugačijih nagiba. Nagib za frekvenciju u rasponu $8 \leq f \leq 150$ je 0,027 V/d.u. Prema teoriji, ovaj nagib je jednak omjeru $2,3RT/2\alpha nF$ te se dobiva $\alpha n = 1,09$, a ukoliko se pretpostavi $n = 2$, dobiva se $\alpha = 0,55$. Nagib segmenta b iznosi 0,123 V/d.u. te govori o promjenama u simetriji energetske barijere u redoks reakciji. Ukupna vršna struja odziva linearno ovisi o korijenu frekvencije ukoliko je $f \leq 150$ Hz. Prikazivanjem logaritma ukupne vršne struje odziva s logaritmom frekvencije dobiva se linearna ovisnost s nagibom 0,45 (kad je $f < 150$ Hz), što je blizu teorijskoj vrijednost od 0,5 koja se očekuje kod difuzijski kontroliranih elektrodnih procesa. Mjerenja cikličkom voltametrijom dala su slične rezultate za ovisnost između ukupne vršne struje i brzine promjene potencijala. Ovi rezultati se mogu objasniti modelom površinske difuzije koja je u osnovi jednaka difuziji otopljenih molekula.²²⁴ Kod ovog modela, reakcija prijenosa naboja započinje na granici tri faze gdje se nalaze elektroda, otopina elektrolita i mikrokristal. To je jedini dio krute čestice gdje su i elektroni i protoni dostupni. S ovog mjesta elektroni se prenose na

površinu elektrode, a do njega dolaze preko površine mikrokristala putem elektronskih prijelaza između susjednih, nepokretnih elektronskih centara.

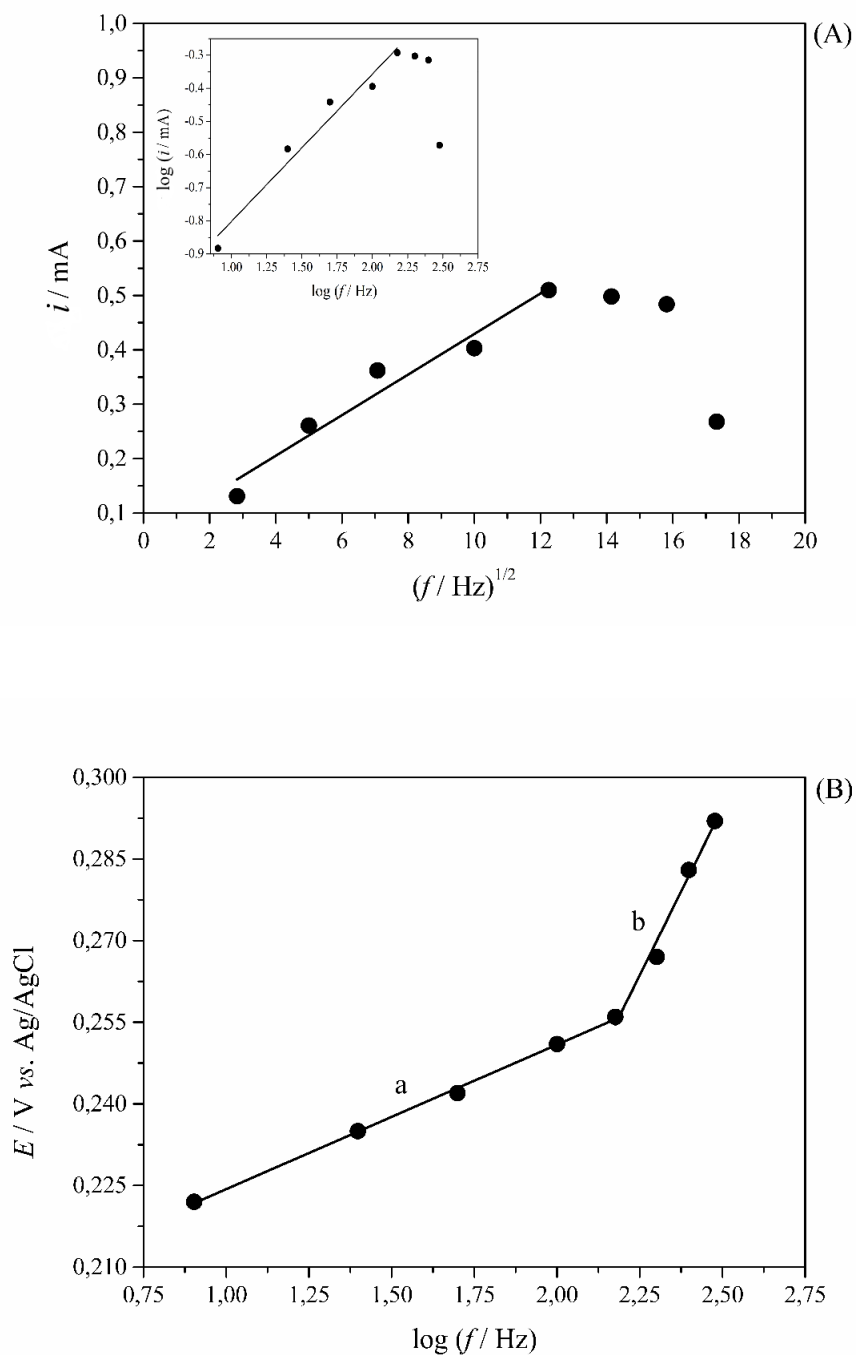


Slika 4.5. Pravokutnovalni voltamogrami mikrokristala kapsaicina pri frekvencijama 150 Hz (A) i 8 Hz (B) u 0,1 mol dm⁻³ KNO₃. Ostali eksperimentalni uvjeti su: pH 11,0, $E_{sw} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV. Na slici su prikazani strujni val 1, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

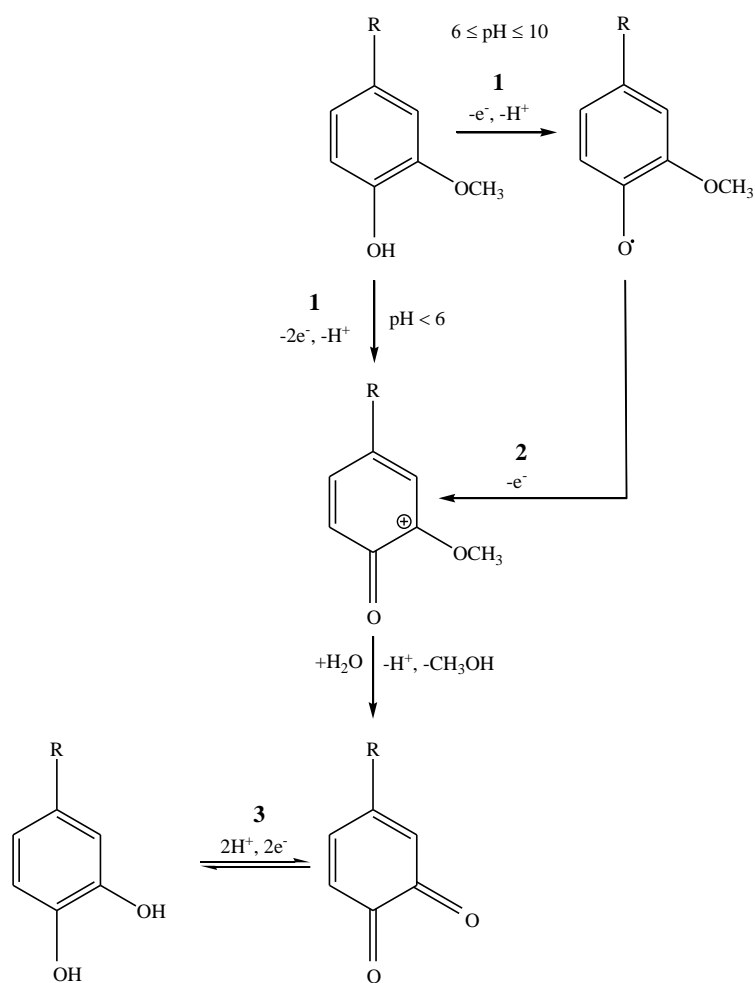
Rezultati dobiveni pri različitim pH-vrijednostima pokazuju značajnu ovisnost mehanizma elektrokemijske oksidacije o pH-vrijednosti što je u skladu s prethodnim radovima o elektrokemiji kapsaicina i drugih *o*-metoksifenola.^{198, 223, 226–228} Glavni val 1 kapsaicina vezan je uz oksidaciju hidroksilne skupine u benzenskom prstenu. Ovisno o pH (slika 4.7.), oksidacija hidroksilne skupine u molekuli kapsaicina zbiva se putem dva mehanizma. Pri neutralnim i lužnatim uvjetima ($6 \leq \text{pH} \leq 10$), oksidacija se odvija preko dva odvojena jednoelektronska koraka (EE mehanizam). Prvi prijenos elektrona omogućuje stvaranje fenoksi radikala (val 1) koji se dalje oksidira u fenoksonijev kation kapsaicina preko jednoelektronskog prijenosa (val 2). Neto struja odziva je za prvi anodni val 1 puno veća nego za drugi val 2, što znači da je prva elektrodna reakcija puno brža od druge. Oksidacija *o*-metoksifenolne grupe u fenoksi radikal u kapsaicinu zbiva se pri pozitivnijim potencijalima kako se smanjuje pH-vrijednost (slika 4.4.), dok je potencijal za oksidaciju fenoksi radikala u fenoksonijev kation gotovo neovisan o pH-vrijednosti. U skladu s time, potencijal drugog jednoelektronskog koraka je sličan ili manje pozitivan od potencijala prvog gubitka jednog elektrona te se ova dva procesa (koraka) spajaju u jedan val pri $\text{pH} < 6$.

Zbog toga se oksidacija kapsaicina u kiselom mediju odvija preko prijenosa dva elektrona u jednom koraku i dolazi do nastanka fenoksonijevog kationa kapsaicina. Fenoksonijev kation podliježe hidrolizi i formira se elektroaktivna *o*-benzokinonska jedinica u strukturi kapsaicina koja se reverzibilno reducira pri potencijalu negativnijem od potencijala glavnog vala čime nastaje kateholna jedinica.^{197, 223, 228}

Do sada se elektrokemijsko ponašanje kapsaicina u jako kiselim uvjetima nije detaljno proučavalo, no u literaturi postoji dosta istraživanja o elektrokemiji različitih *o*-metoksifenola. Prema Samet i sur.²²⁷, otopljeni *o*-metoksifenol u vodenoj otopini pri $\text{pH} < \text{p}K_a$ podliježe jednoelektronskoj oksidaciji što dovodi do nastanka fenoksi radikala koji sekundarnim prijenosom elektrona prelaze u fenoksonijev kation ili dolazi do reakcija dimerizacije i polimerizacije na površini elektrode. Vermillion i sur.²²⁶ predložili su da je potonji mehanizam dominantan. Uzevši u obzir dobivene rezultate i postojeće literaturne podatke, može se zaključiti da se za $\text{pH} > \text{p}K_a$ oksidacija kapsaicina u produkt koji sadrži fenoksonijev kation zbiva putem dvoelektronskog prijelaza u jednom koraku te se nastali produkt ove reakcije otapa u elektrolitu.



Slika 4.6. Ovisnost vršne struje vala 1 mikrokristala kapsaicina o drugom korijenu frekvencije (A) i ovisnost vršnog potencijala vala 1 o logaritmu frekvencije (B). Umetak na slici A: ovisnost $\log(i)$ vs. $\log(f)$. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.3.



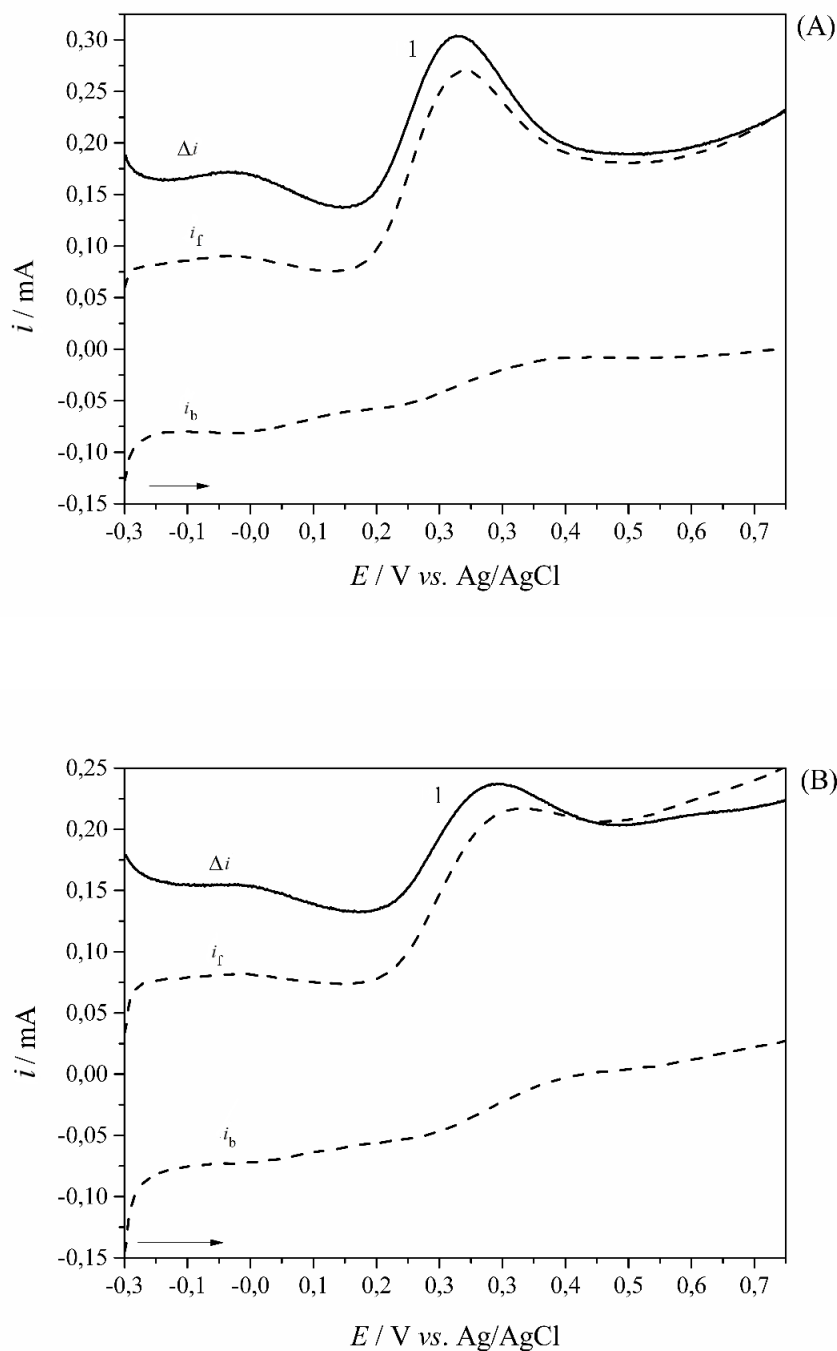
Slika 4.7. Predloženi mehanizam oksidacije mikrokristala kapsaicina.

4.1.2. Analiza čili paprika pomoću voltametrije imobiliziranih mikrokristala

Nakon elektrokemijske karakterizacije kapsaicina, ispitana je primjenjivost voltametrije imobiliziranih mikrokristala na PIGE u određivanju kapsaicina u uzorcima različitih čili paprika u obliku praha i određivanja njihove ljutine na temelju voltametrijskih odziva. Optimalni eksperimentalni uvjeti za analizu kapsaicina u čili paprikama bili su: frekvencija 150 Hz i pH-vrijednost 11,0. Pri ovim uvjetima dobiven je najizraženiji i najbolje definiran val pomoću pravokutnovalne voltametrije. Analitička primjenjivost pravokutnovalne voltametrije mikrokristala na PIGE ispitana je na temelju omjera koncentracija - strujni odziv te ispitivanjem osjetljivosti i ponovljivosti metode. Odnos voltametrijskog odgovora i masenog udjela kapsaicina ispitivan je mjerenjem odziva SWV struje za seriju razrjeđenja kapsaicina kalcijevim karbonatom (CaCO_3).

Rezultati su pokazali da dolazi do linearnog smanjenja struje sa razrjeđenjima u rasponu koncentracija od 0,01 mg kapsaicina/g CaCO_3 do 17,2 mg kapsaicina/g CaCO_3 . Najniži maseni udio kapsaicina u smjesi s CaCO_3 koji se mogao detektirati pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima bio je 10 ppm. Ponovljivost metode ispitivana je određivanjem kapsaicina u deset uzastopnih mjerenja. Ukupni vršni potencijal odziva kapsaicinoida bio je ponovljiv s maksimalnom devijacijom od 4,8 %, dok je relativna standardna devijacija odziva vršne struje iznosila 11,3 %. Ovi rezultati upućuju da se kapsaicin može određivati u prisutnosti druge elektroneaktivne tvari sa dobrom preciznošću i osjetljivošću.

U ovom radu analizirano je devet ljutih i dvije slatke čili paprike u prahu. Za ljute čili paprike dobiveni su slični SWV-profil, odnosno dobiven je jedan ireverzibilni anodni val. Primjeri pravokutnovalnih voltamograma za uzorke dviju različitih ljutih čili paprika, Bhut Jolokiu i Fatalli, prikazani su na slici 4.8. Odzivi uzoraka sastoje se od jednog dobro definiranog vala 1 pri vršnom potencijalu od 0,288 V za čili papriku Bhut Jolokiu te pri 0,323 V za čili papriku Fatalli. Proučavanjem početne i povratne komponente vršne struje voltamograma, može se zaključiti da je elektrodna reakcija i za ove uzorke ireverzibilna. Ukoliko se dobiveni rezultati za ove čili paprike usporede s voltametrijskim odzivom za čisti kapsaicin (slika 4.5. A), odziv dobiven za uzorke ispitivanih ljutih čili paprika može se pripisati oksidaciji fenolne skupine u molekuli kapsaicina. Međutim, valja napomenuti da na dobivenim pravokutnovalnim voltamogramima za uzorke slatkih paprika nema vidljivih odziva koji bi odgovarali oksidaciji kapsaicina.



Slika 4.8. Pravokutnovalna voltometrija provedena na mikrokristalima čili paprika Bhut Jolokia (A) i Fatalli (B) imobiliziranih na površini PIGE i uronjenih u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11. Ostali eksperimentalni uvjeti: $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$ i $f = 150 \text{ Hz}$. Na slici su prikazani strujni val 1, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

U tablici 4.1. navedeni su svi ukupni vršni potencijali i vršne struje koji su eksperimentalno dobiveni za uzorke čili paprika koristeći predloženu metodu. Ukupni vršni potencijali za ljute čili paprike kretali su se u rasponu potencijala od 0,282 V do 0,333 V što je u skladu s dobivenim oksidacijskim potencijalom za standard kapsaicin ($E_{p,1} = 0,256$ V). Pomak ukupnog vršnog potencijala za ljute čili paprike prema pozitivnijim vrijednostima u usporedbi sa standardom kapsaicina može se objasniti ukupnim učinkom svih prirodno prisutnih kapsaicinoida u ljutim čili paprikama (uključujući dihidrokapsaicin te manje količine nordihidrokapisaicina, homokapsaicina, homodihidrokapisaicina itd.) koji oksidiraju pri drugačijim potencijalima.^{197,222} U skladu s tim, može se pretpostaviti da intenzitet vala 1 pri potencijalu od 0,311 ($\pm 0,019$) V nije povezan isključivo s kapsaicinom, već sa ukupnom količinom svih kapsaicinoida u određenom uzorku. Zbog ovog razloga, bolje je kalibrirati senzor prema uzorku čili paprike poznate ljutine, nego prema čistom standardu kapsaicina.

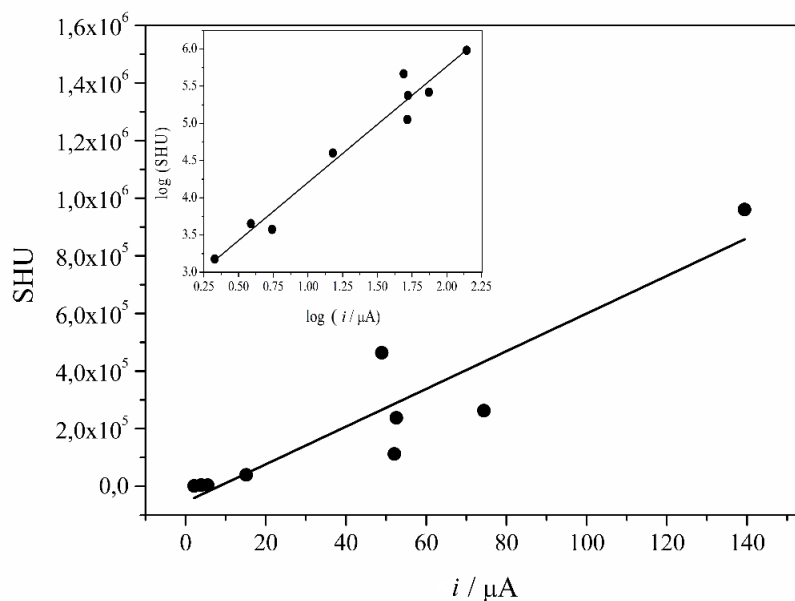
Tablica 4.1. Vrijednosti vršnih struja i vršnih potencijala vala 1 ($E_{p,1}$) (srednje vrijednosti šest ponavljanja \pm standardna devijacija) dobivenih abrazivnom pravokutnovalnom voltametrijom na uzorcima čili paprika na PIGE uronjenoj u 0,1 mol dm⁻³ KNO₃ pri pH 11,0. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.8.

Paprika	Scoville-ove jedinice ljutine	$E_{p,1}$ / V	i / μ A
Bhut Jolokia ^a	880000-1041427	0,288 \pm 0,014	139,37 \pm 11,25
Red Savina ^b	350000 - 577000	0,309 \pm 0,015	40,28 \pm 7,61
Fatalli ^b	125000 - 400000	0,326 \pm 0,017	74,38 \pm 13,05
Habanero Orange ^b	150000 - 325000	0,333 \pm 0,012	52,55 \pm 9,04
Carolina Cayenne ^c	100000 - 125000	0,290 \pm 0,020	52,06 \pm 6,85
Cayenne ^d	30000 – 50000	0,282 \pm 0,019	15,11 \pm 3,07
Jalapeno ^a	2500 - 5000	0,288 \pm 0,016	5,52 \pm 1,04
Ancho ^a	1000 - 2000 ^d	0,325 \pm 0,018	2,13 \pm 0,32
Ljuta mađarska paprika ^e	1000 - 8000	0,317 \pm 0,019	3,88 \pm 0,76
Slatka paprika ^c	0	n.d.	n.d.
Slatka paprika ^d	0	n.d.	n.d.

^a Harissa; ^b Volim Ljuto; ^c Začini Bušić; ^d Kotányi; ^e Šafram

Kao što se može vidjeti u tablici 4.1., najintenzivniji signal dobiven je za čili papriku Bhut Jolokia ($\Delta i = 139,37 \mu\text{A}$), koja je ujedno proglašena i najljućom paprikom prema Scoville-ovoj skali.^{41,228} Zatim je sljedeći najintenzivniji signal dobiven za čili papriku Fatalli ($\Delta i = 74,38 \mu\text{A}$), a slijede čili paprike Habanero Orange ($\Delta i = 52,55 \mu\text{A}$), Carolina Cayenne ($\Delta i = 52,06 \mu\text{A}$) i Red Savina ($\Delta i = 40,28 \mu\text{A}$), odnosno sve paprike koje spadaju u kategoriju jako ljutih čili paprika.⁴¹ Čili paprika Cayenne, koja ima jačinu 30000-50000 SHU te je klasificirana kao ljuta čili paprika, imala je odziv struje od $15,11 \mu\text{A}$. Niski intenziteti struja dobiveni su za čili paprike Ancho, Japaleno i ljutu mađarsku papriku koje spadaju u skupinu slabo i/ili srednje ljutih paprika.⁴¹ Kao što je već spomenuto, slatke paprike nisu imale voltametrijski odziv, što je bilo za očekivati, s obzirom da, prema literaturi, slatke vrste paprika ne sadrže mjerljivu količinu analoga kapsaicina i posljedično nemaju definiran raspon prema Scoville-ovoj tablici ljutine.^{42,229}

Kako bi se razjasnilo može li se dobiveni voltametrijski odziv uzoraka čili paprika koristiti za klasifikaciju paprika s obzirom na ljutinu, dobiveni odzivi struja prikazani su u ovisnosti o prosječnoj vrijednosti Scovilleovih jedinica ljutine iz literature (slika 4.9.).^{228,229} Korelacijski koeficijent od 91,3 % ukazuje na dobru pozitivnu korelaciju između ovih parametara. Grafički prikaz ovisnosti logaritma neto struja s logaritmom prosječnih vrijednosti Scovilleovih jedinica ljutine prikazan je u umetku slike 4.9. Ovi rezultati govore da se opisana metodologija može primijeniti za direktno razlikovanje čili paprika različite ljutine. Metoda se bazira na mjerenju odziva vršnih struja kapsaicinoida u uzorcima čili paprika koje se inače koriste kao začini, u svrhu klasificiranja uzoraka prema njihovoj ljutini. U analitičke svrhe, senzor mora biti kalibriran jer jačina struje ovisi o veličini mikrokristala²³⁰ koja može biti promjenjiva od uzorka do uzorka. Kalibracija metode može se provesti na način da se kao standard uzme najljuća paprika (Bhut Jolokia) koja je karakterizirana Scovilleovim jedinicama ljutine od $(1 \pm 0,1) \cdot 10^6$. Dobivena jačina struje nepoznatog uzorka podijeli se sa jačinom struje uzorka standarda, te ukoliko je ovaj omjer $0,4 \pm 0,1$, ljutina uzorka je u intervalu $(1-6) \cdot 10^5$ SHU, odnosno uzorak ima *vrlo jaku ljutinu*. Omjer manji od 0,05 sugerira da je ljutina niža od 10^4 Scovilleovih jedinica ljutine te uzorak ima samo *blagu do srednju ljutinu*, a ukoliko je ovaj omjer između 0,05 i 0,3, uzorak ima *jaku ljutinu*.



Slika 4.9. Ovisnost eksperimentalno dobivenih vršnih struja i prosječnih Scovilleovih jedinica ljutine u devet uzoraka čili paprika. Umetak slike: ovisnost logaritma vršnih struja i logaritma prosječnih Scovilleovih jedinica ljutine. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.8.

Nakon karakterizacije kapsaicina u obliku mirokristala na površini PIGE i zaključku da se mogu kvalitativno odrediti kapsaicinoidi u uzorcima ljutih čili paprika, pristupilo se njihovoj kvantifikaciji u istim uzorcima. Međutim, kvantitativna analiza kapsaicina koristeći VIM je gotovo nemoguća jer je teško kontrolirati količinu uzorka koja se abrazivno nanosi na površinu elektrode. Kako bi se nadišao ovaj problem, Doménech-Carbó i suradnici²³¹ razvili su metodologiju za kvantifikaciju krutina pomoću VIM koristeći smjesu tvari koja se analizira i elektroaktivne referentne tvari. Iako je količina smjese dviju tvari koja se nanosi na elektrodu nepoznata, njihove relativne količine su jednake njihovim poznatim masenim udjelima u originalnoj smjesi te proporcionalne omjeru njihovih strujnih odziva.

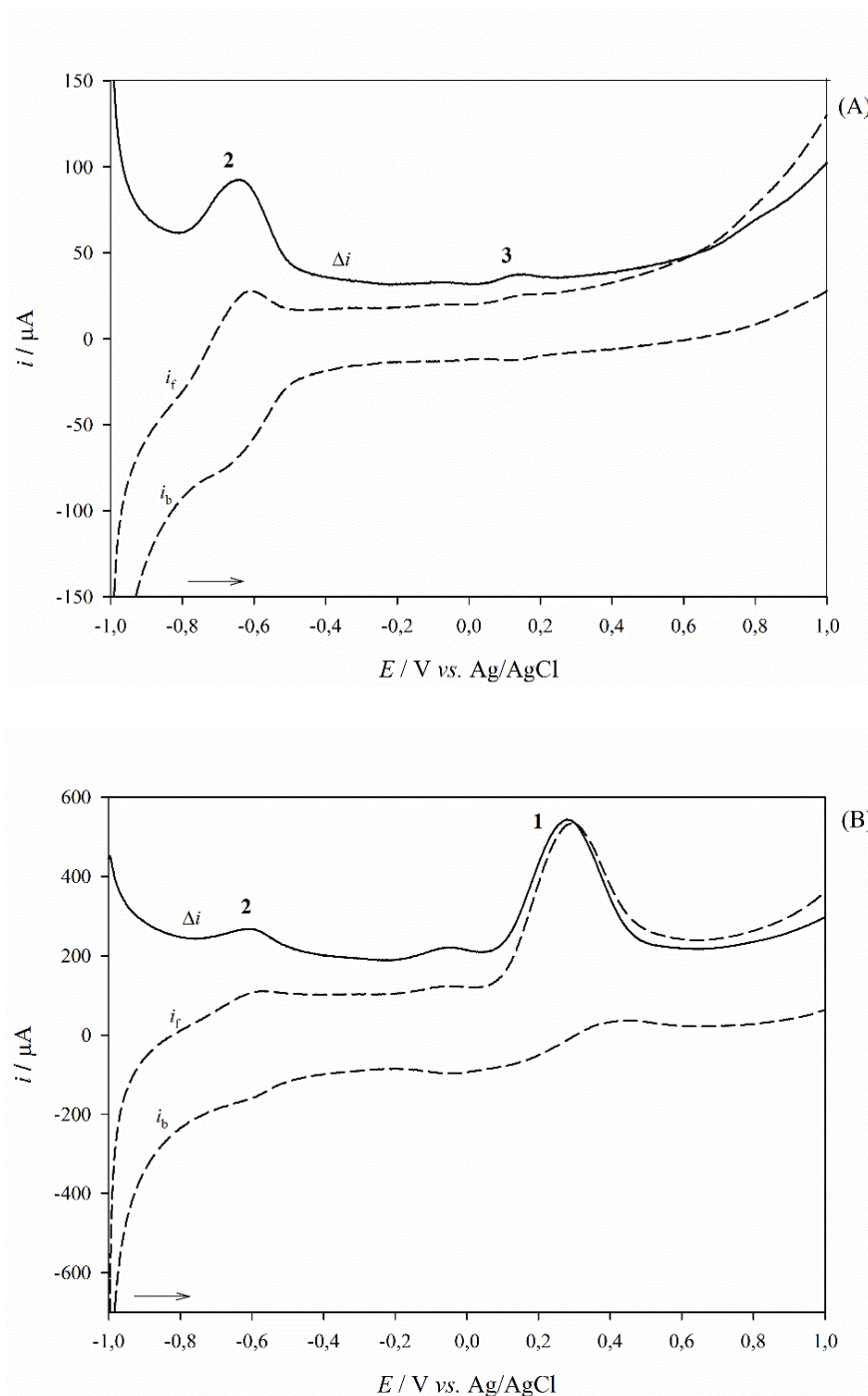
Odabir referentne tvari ovisi o sljedećim uvjetima:

- (i) oksidacija referentne komponente mora biti na vršnom potencijalu koji se bitno razlikuje od potencijala oksidacije analita, i
- (ii) ne smije doći do međusobnog djelovanja ili reakcije između analita i referentne komponente.

U ovom istraživanju, indigo je ispitan kao referentna komponenta jer su njegova voltametrijska svojstva u krutom stanju relativno dobro poznata.²³² Na slici 4.10. (A) prikazan je

pravokutnovalni voltamogram oksidacije indiga pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima te se može vidjeti da se sastoji od dobro definiranog vala 2 pri potencijalu od -0,639 V i slabo definiranog vala 3 pri +0,137 V. Ranije je prikazano da se oksidacija kapsaicina primjenom pravokutnovalne voltametrije zbiva pri +0,258 V, ukoliko se radi o anodnom skenu počevši od -1,0 V (slika 4.5. A). Oznake 2 i 3 korištene su za oksidacijske valove indiga jer je zatim analizirana smjesa indiga i kapsaicina. SWV odziv smjese krutina kapsaicina i indiga prikazan je na slici 4.10. (B) i može se vidjeti da se sastoji od dva dobro izražena i odvojena vala, vala 2 pri potencijalu od -0,588 V koji odgovara oksidaciji indiga te vala 1 pri +0,288 V koji odgovara oksidaciji kapsaicina. Odziv kapsaicina (val 1) se preklapa s odzivom vala 3 od indiga (slika 4.10. A) i zbog toga se val 3 ne vidi na SWV odzivu smjese kapsaicina i indiga. Ukupna vršna struja drugog odziva indiga (val 3) je jako niska (reda veličine 10^{-7} μA) pa se može pretpostaviti da je doprinos te struje ukupnoj struji oksidacije kapsaicina zanemariv. Prije svakog mjerenja ispitivanog analita sniman je pravokutnovalni voltamogram čiste PIGE, odnosno bez imobilizirane tvari na površini elektrode te je vrh pri -0,1 V uvijek bio prisutan i pripisuje se odzivu pufera.

Ponovljivost je ispitana pomoću serije neovisnih mjerenja na šest svježe pripremljenih elektroda modificiranih sa smjesom kapsaicina i indiga (1/1, w/w). Potencijali dobivenih odziva bili su ponovljivi s maksimalnim odstupanjem od oko 6%, dok je relativna standardna devijacija omjera odziva struja bila oko 26%. Relativno veliko standardno odstupanje omjera odziva struja javlja se zbog manjka uniformiranosti (homogenosti) nanošenja mikrokristala na površinu PIGE. Zbog toga su testovi ponovljivosti ponovljeni sa reakcijskom smjesom koja je razrijeđena sepiolitom, elektroneaktivnom filosilikatnom glinom, u omjeru kapsaicin/indigo/sepiolit = 1/1/1. Standardno odstupanje omjera odziva struja smanjeno je na 3,4% pa su daljnji eksperimenti provedeni sa smjesom analita, indiga i sepiolita.

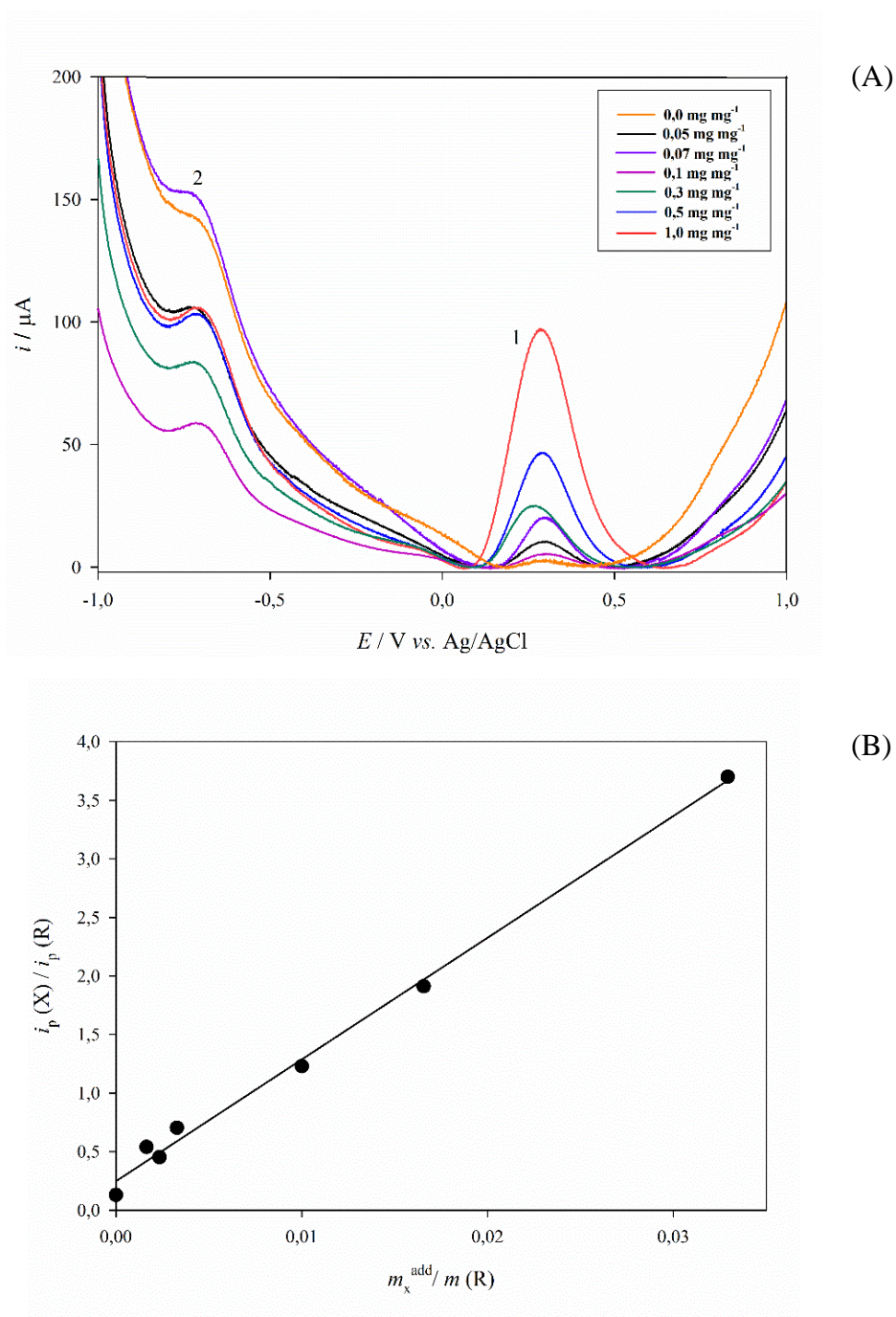


Slika 4.10. Voltamogrami dobiveni pravokutnovalnom voltametrijom za mikrokristale indiga (A) i smjesu indiga i kapsaicina (1/1, w/w) (B) u 0,1 mol dm⁻³ KNO₃, pH 11,0. Na slici su prikazani strujni val 1, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.8.

Na slici 4.11. (A) prikazani su SWV voltamogrami dobiveni za smjesu čili paprike Habanero Orange, indiga i sepiolita u koju je postepeno dodavana sve veća količina standarda kapsaicina. Također, na slici 4.11. (B) prikazan je i dobiveni pripadajući odnos struja prema masenim udjelima ($[i_p(X) / i_p(R)]$ versus (m_X^* / m_R)). SWV odziv ove smjese karakteriziran je dvama anodnim valovima, valom 2 pri potencijalu od -0,687 V i valom 1 pri +0,292 V, koji odgovaraju oksidacijama indiga i kapsaicina, kao što je ranije definirano. Slično elektrokemijsko ponašanje zabilježeno je i za druge ispitivane čili paprike u smjesi s indigom i sepiolitom. Blagi pomak ukupnih vršnih potencijala za uzorke čili paprika prema više pozitivnim vrijednostima u usporedbi s vršnim potencijalom za čisti kapsaicin ($E_{p,1} = +0,258$ V) rezultat je već ranije spomenutog sinergijskog učinka svih prirodnih kapsaicinoida u uzorcima čili paprika (uključujući dihidrokapsaicin i manje količine nordihidrokapisaicina, homokapsaicina, homodihidrokapisaicina itd.) jer navedeni spojevi imaju malo drugačije oksidacijske potencijale od kapsaicina. Sukladno tome, intenzitet vala na potencijalu +0,290 V nije povezan isključivo s kapsaicinom, već obuhvaća ukupne kapsaicinoide u određenom uzorku. Štoviše, ranije je spomenuta i prikazana pozitivna korelacija između SWV odziva vršnih struja koje odgovaraju ukupnim kapsaicinoidima u uzorcima čili paprika i Scovilleovih jedinica ljutine navedenih u literaturi što upućuje da su dobiveni SWV odzivi vršnih struja direktno proporcionalni koncentraciji ukupnih kapsaicinoida u uzorcima, odnosno ljutini čili paprika.

Kvantifikacija ukupnih kapsaicinoida u komercijalno dostupnim uzorcima čili paprika provedena je pomoću standardne metode dodatka opisane u poglavlju 3. Materijali i metode, stranica 44. Kalibracijske krivulje dobivene su za smjese čili paprika + indigo + sepiolit s omjerima m_X^* / m_R u rasponu od 0,0 do 0,03 mg mg⁻¹. Linearne ovisnosti $[\Delta i_p(X) / \Delta i_p(R)]$ versus (m_X^* / m_R) dobivene su za sve ispitivane čili paprike s koeficijentima korelacije u rasponu od 0,972 do 0,999 (slika 4.11. B).

Rezultati dobiveni standardnom metodom dodatka za određivanje udjela kapsaicinoida u uzorcima čili paprika navedeni su u tablici 4.2. Koncentracije kapsaicinoida u analiziranim uzorcima kreće se u rasponu od 0,27 % do 1,41 % mase kapsaicinoida / masi čili paprike što je u skladu s rezultatima dobivenim drugim analitičkim tehnikama kao što je HPLC.^{234, 235} Ukoliko se koncentracija kapsaicinoida u čili paprici Bhut Jolokia pripiše razini ljutine od $1 \cdot 10^6$ SHU²²⁹, ljutina ostalih čili paprika može se procijeniti iz linearnog odnosa koncentracije kapsaicinoida i razine ljutine.^{235, 236} Ove procjene prikazane su u zadnjem stupcu tablice 4.2.



Slika 4.11. Pravokutnovalni voltamogrami za različite dodatke standarda kapsaicina u smjesu čili paprike Habanero Orange, dobiveni u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11 (A) te ovisnost omjera vršnih struja analita i referentne komponente i omjera mase dodatka i mase referentne komponente (B). Na slici (A) prikazani su strujni valovi 1 i 2 te ukupni SWV odzivi (Δi). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.8.

Vrijednosti za čili paprike Red Savina i Fatalli su u skladu s rezultatima organoleptičke metode, ali za ostale dvije paprike (Habanero Orange i Carolina Cayenne) procijenjene razine su nešto više.²²⁹ Odstupanja u rezultatima mogu se objasniti različitim okolišnim uvjetima prilikom uzgoja čili paprike, tehnološkom obradom čili paprike u prehrambenoj industriji i genetskim čimbenicima. Okolišni uvjeti koji mogu utjecati na sadržaj kapsaicinoida uključuju nedostatak vode⁴³, dodatak mineralnih tvari²³⁶ i opskrbu dušikom²³⁷. Nadalje, sadržaj kapsaicinoida u čili paprici može varirati kod različitih plodova unutar iste biljke, čak i kada su ubrane istovremeno. U sklopu tehnološke obrade čili paprike, sušenje, mljevenje i visoka temperatura mogu imati veliki utjecaj na sadržaj kapsaicinoida u plodu. Ovi čimbenici mogu biti negativan faktor za stabilnost kapsaicinoida u određenim vrstama čili paprika, tako da obrada može utjecati na ukupni sadržaj kapsaicinoida. Također, nije zanemarivo spomenuti da su kapsaicinoidi uglavnom sintetizirani i koncentrirani u posteljici ploda čili paprike, tako da je ukupni sadržaj kapsaicinoida u prahu čili paprika promjenjiv jer nije poznato koji je dio čili paprike dehidriran u tehnološkom procesu.^{42, 43}

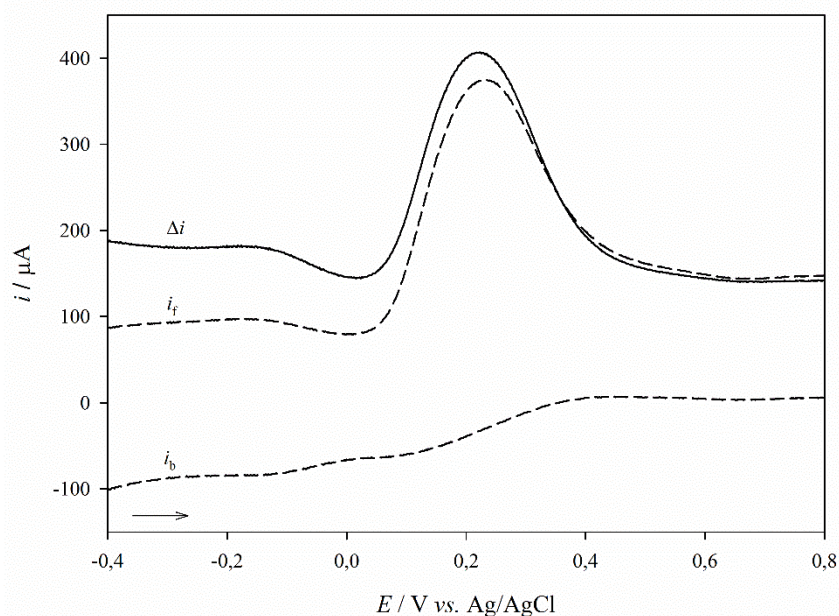
Tablica 4.2. Podaci dobiveni iz kalibracijskih krivulja za različite uzorke čili paprika dobivenih pravokutnovalnom voltametrijom pri eksperimentalnim uvjetima kao na slici 4.8.

Čili paprika	Nagib	Odsječak na y-osi	$m_X/m \cdot 100\%$	SHU
Bhut Jolokia ^a	116,95	0,8233	1,410	$1,0 \cdot 10^6$
Red Savina ^b	124,22	0,3661	0,590	$4,2 \cdot 10^5$
Fatalli ^b	103,71	0,2832	0,546	$3,9 \cdot 10^5$
Habanero Orange ^b	103,50	0,2708	0,523	$3,7 \cdot 10^5$
Carolina Cayenne ^c	179,19	0,2423	0,270	$1,9 \cdot 10^5$

^a Harissa; ^b Volim Ljuto; ^c Začini Bušić

4.1.3. Analiza kapsaicina i čili paprika pomoću voltametrije imobiliziranih mikrofilmova

Glavni nedostatak metode standardnog dodatka je potreba za relativno velikim količinama uzorka i standarda. Stoga je ispitana primjenjivost još jedne elektroanalitičke metode, voltametrija imobiliziranog filma koju su razvili Gulppi i suradnici^{216, 239} za ispitivanje kapsaicinoida u čili paprikama. Ova metoda omogućuje elektrokemijsku analizu tragova u mikro uzorcima što je velika prednost za takva mjerenja²³⁸ te je u ovom radu prvo primijenjena za elektrokemijsku analizu kapsaicinoida. Osnova i način izvođenja metode objašnjeni su u poglavlju 3.2.1.2.

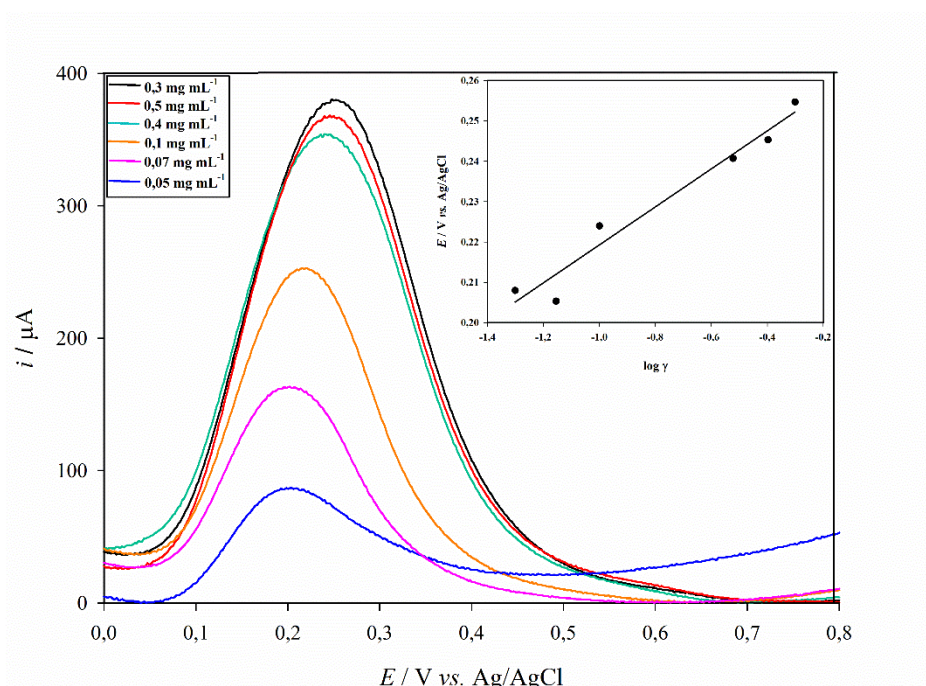


Slika 4.12. Pravokutnovalni voltamogram koji odgovara oksidaciji precipitata kapsaicina koncentracije 1 g dm^{-3} imobiliziranog na PIGE i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f=150 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni val 1, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Na slici 4.12. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za 1 g dm^{-3} standarda kapsaicina pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima (vođeni elektrolit pH 11, $f = 150 \text{ Hz}$) u obliku imobiliziranog filma na površini PIGE. Ukupni odziv sastoji se od jednog oksidacijskog vala na potencijalu od $+0,254 \text{ V}$ što je približno jednako potencijalu pri kojem oksidiraju

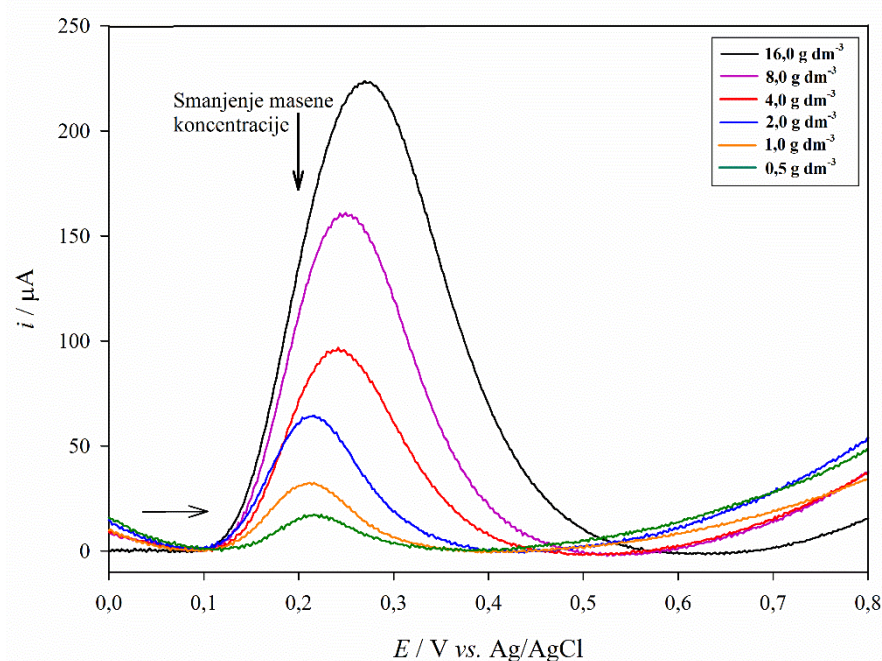
mikrokristali kapsaicina. Početna (oksidacijska) i povratna (redukcijska) komponenta struje ukazuju da se radi o ireverzibilnoj oksidaciji hidroksilne skupine u benzenskom prstenu kapsaicina. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima dobivenima za mikrokristale kapsaicina (slika 4.5. A) te se može zaključiti da i u obliku mikrokristala i mikrofilma, kapsaicin prati isti mehanizam oksidacije.

Odziv dobiven pravokutnovalnom voltametrijom za imobilizirani mikrofilm kapsaicina na površini PIGE ovisi o njegovoj koncentraciji. Odgovarajući pravokutnovalni voltamogrami dobiveni za različite koncentracije kapsaicina ispitivanih u obliku mikrofilma prikazani su na slici 4.13. Ukupni vršni potencijal linearno se mijenja u pozitivnom smjeru povećanjem koncentracije kapsaicina imobiliziranog u obliku mikrofilma na površinu elektrode (umetak na slici 4.13.), tj. potrebna je veća energija za elektrooksidaciju što je koncentracija kapsaicina veća. Ovaj se fenomen može objasniti na temelju steričkog učinka elektroneaktivnih hidrofobnih dijelova molekule kapsaicina koje dovode do smetnji u prijenosu naboja.



Slika 4.13. Pravokutnovalni voltamogrami za različite koncentracije otopine kapsaicina u etanolu i imobiliziranih na površinu PIGE u obliku precipitiranog filma i snimljenih u 0,1 mol dm⁻³ KNO₃, pH 11. Umetak na slici: grafički prikaz ovisnosti vršnih potencijala o logaritmu masene koncentracije kapsaicina. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.12.

Ukupna vršna struja raste s povećanjem koncentracije kapsaicina precipitiranog na površinu elektrode, a odnos između ukupne vršne struje i koncentracije je linearan s koeficijentom korelacije $r = 0,935$. Međutim, za koncentracije veće od $0,3 \text{ g dm}^{-3}$ voltametrijski odziv, odnosno ukupna vršna struja, počinje padati. Vjerojatni razlog ove pojave može biti zasićenje površine elektrode molekulama analita. Naime, ugljikovodični lanac kapsaicina blokira prijenos elektrona prema površini elektrode što dovodi do značajnog pada vrijednosti ukupne vršne struje i pomaka potencijala prema pozitivnijim vrijednostima.

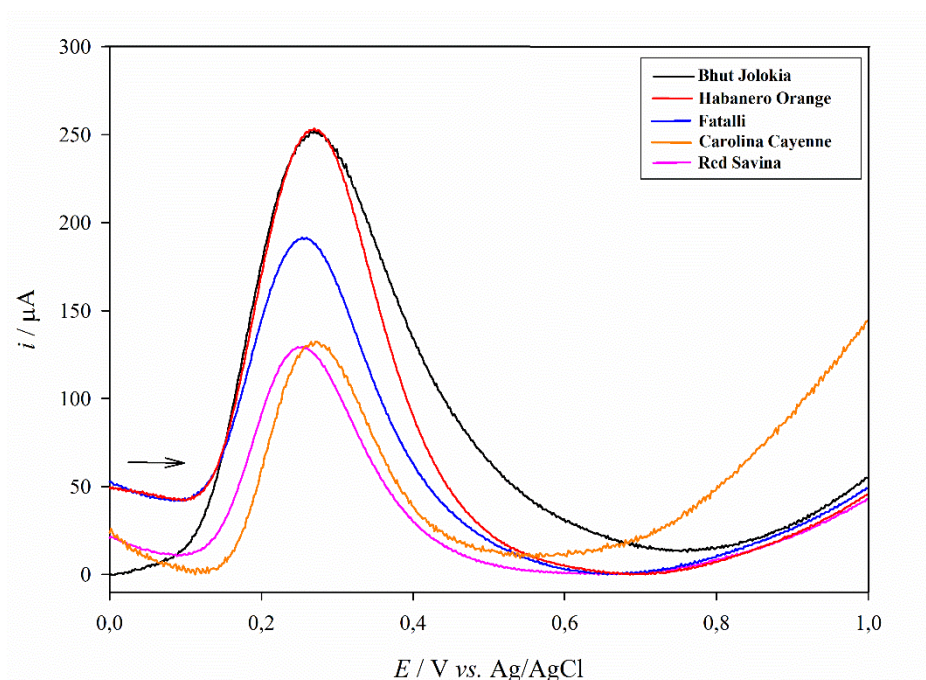


Slika 4.14. Pravokutnovalni voltamogrami dobiveni za oksidaciju ekstrakata različitog udjela čili paprike Habanero Orange mjerenih u obliku precipitiranog filma na PIGE koja je uronjena u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.12.

Pravokutnovalni odzivi za različite koncentracije čili paprike Habanero Orange u obliku imobiliziranog mikrofilma prikazani su na slici 4.14. Ukoliko je masena koncentracija čili paprike Habanero Orange bila 16 g dm^{-3} , voltamogram se sastoji od jednog ireverzibilnog oksidacijskog vrha pri $E = +0,271 \text{ V}$, što je u skladu s elektrokemijskim ponašanjem čistog kapsaicina. Sa smanjenjem masene koncentracije kapsaicinoida u ekstraktu čili paprika, opažen je blagi pomak potencijala prema negativnijim vrijednostima, kao i za kapsaicin, što je prethodno objašnjeno steričkim učincima. Za sve ispitane uzorke, ukupne vršne struje linearno

se povećavaju s povećanjem masene koncentracije. Međutim, kod koncentracija iznad 8 g dm^{-3} , ukupna vršna struja doseže maksimum zbog zasićenja površine elektrode. Slično je ponašanje zabilježeno za sve ispitane uzorke čili paprika. Ovi rezultati sugeriraju da se ukupna vršna struja potencijalno može koristiti kod kvantitativnog određivanja kapsaicinoida u uzorcima čili paprika.

Slika 4.15. prikazuje pravokutnovalne voltametrijske odzive zabilježene za različite ekstrahirane uzorke čili paprika u obliku imobiliziranog mikrofilma za iste masene koncentracije od 16 g dm^{-3} . Najviši signal zabilježen je za čili papriku Bhut Jolokia ($\Delta i = 266,87 \text{ A}$), nakon čega slijede čili paprike Habanero Orange ($\Delta i = 220,26 \text{ A}$), Fatalli ($\Delta i = 165,53 \text{ A}$), Carolina Cayenne ($\Delta i = 129,96 \text{ A}$) i Red Savina ($\Delta i = 118,30 \text{ A}$). Treba naglasiti da je ovaj trend u skladu s onim dobivenim za uzorke čili paprika u obliku mikrokristala.



Slika 4.15. Pravokutnovalni voltamogrami dobiveni za oksidaciju različitih čili paprika ($\gamma = 16 \text{ g dm}^{-3}$) mjenjenih u obliku precipitiranih filmova na PIGE koja je uronjena u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, pH 11. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.12.

4.2. Elektrokemijska karakterizacija karotenoida

Za elektrokemijsku analizu karotenoida ispitana je primjenjivost tri različite elektrode: GCE, PIGE i mCPE, kao što je opisano u poglavlju 3.3.1. Na elektrodi od staklastog ugljika (GCE) nije moguće izvesti voltametriju imobiliziranih mikrokristala pa su primijenjene voltametrija imobiliziranog mikrofilma i imobilizirane kapi. Međutim, pokazalo se da kod tehnike imobiliziranog mikrofilma dolazi do razlijevanja i isparavanja otapala (acetona) ne samo po aktivnoj površini radne elektrode, već i po teflonskom kalupu. Samim time ne mjeri se odgovarajuća koncentracija ispitivanog standarda. Kada se smanjio volumen otapala (s 5 μL na 2 μL) nije došlo do pojave odziva što je ukazalo na slabu osjetljivost elektrode pri ovim uvjetima. Slični problem je nastao kod tehnike imobilizirane kapi; prilikom formiranja kapi ona se razlijevala po kalupu (elektrokemijski neaktivnom dijelu) radne elektrode jer adhezijske sile između kapi i staklastog ugljika nisu bile dovoljno jake. Ovakvi rezultati brzo su naveli na zaključak da GC elektroda nije odgovarajuća elektroda u ovim analizama te se dalje nastavilo sa parafinom impregniranom grafitnom elektrodom (PIGE) i minijaturiziranom elektrodom od grafitne paste (mCPE), a dobiveni rezultati prikazani su u nastavku.

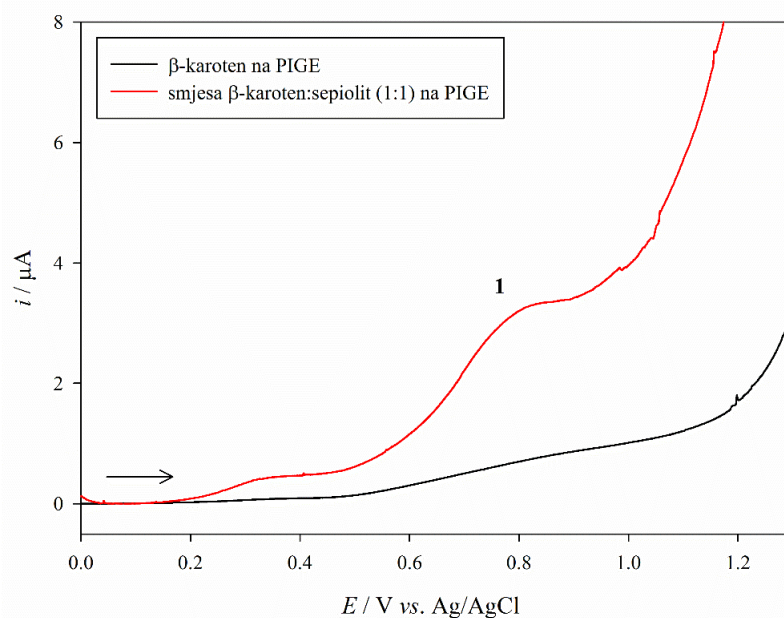
4.2.1. β -Karoten

β -Karoten (strukturna formula na slici 2.3. (A), str. 20) jedan je od najpoznatijih, sveprisutnih prirodnih pigmenata te je strukturna jedinica mnogih biljnih i životinjskih namirnica koje se koriste u svakodnevnoj prehrani. Predvoditelj je velike skupine karotena i do sada su voltametrijske osobine β -karotena istraživane u organskim otapalima i u obliku samostalnih monoslojeva vezanih s tiolnim grupama na površini elektrode ili u obliku nekog derivata koji se onda može istraživati u vodenim otopinama.^{210, 214}

U ovome radu, voltametrijsko ponašanje β -karotena ispitivano je primjenom cikličke i pravokutnovalne voltametrije, a dobiveni rezultati doprinijeli su boljem razumijevanju elektrokemijskih svojstava β -karotena. Doprinos ovog istraživanja je tim veći s obzirom da su istraživanja provedena u vodenom elektrolitu. Primijenjene su voltametrija imobiliziranih mikrokristala, mikrofilma te mikrokapi, međutim nisu dobiveni rezultati voltametrijom imobilizirane mikrokapi. Ostali rezultati slijede u nastavku.

4.2.1.1. Voltimetrija imobiliziranih mikrokristala β -karotena

Inicijalna ispitivanja elektrooksidacije β -karotena provedena su primjenom voltimetrije imobiliziranih mikrokristala na površini parafinom impregnirane grafitne elektrode (PIGE) i uranjanjem elektrode u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Izbor $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ perklorne kiseline (HClO_4) temelji se na literaturnim podacima gdje je dokazana veća osjetljivost u elektrokemijskom određivanju karotenoida u ovom elektrolitu.^{213, 240} Perklorna kiselina korištena je kao elektrolit i u ostalim elektrokemijskim analizama karotenoida u ovom radu.

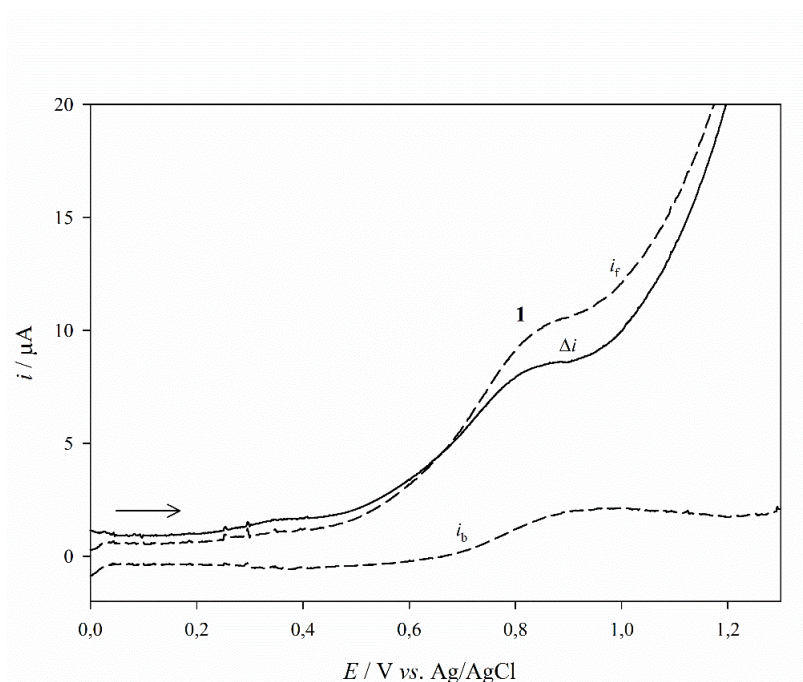


Slika 4.16. Pravokutnovalni voltamogrami mikrokristala β -karotena (crna linija) i smjese β -karoten:sepiolit (1:1,w/w) (crvena linija) imobiliziranih na površinu PIGE i uronjenih u vodenu otopinu $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Prikazani su strujni val 1 i ukupni SWV odziv (Δi).

Na slici 4.16. prikazani su pravokutnovalni odzivi za oksidaciju mikrokristala β -karotena snimljenih na elektrodi PIGE uz sljedeće eksperimentalne uvjete: frekvencija pobude, $f = 10 \text{ Hz}$, amplituda pobude, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i korak potencijala, $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Može se primijetiti da nije dobiven voltametrijski odziv kada je na površinu PIGE imobiliziran čisti β -karoten (crna linija). Mogući razlog tome je visoko lipofilna priroda β -karotena zbog koje u hidrofilnom

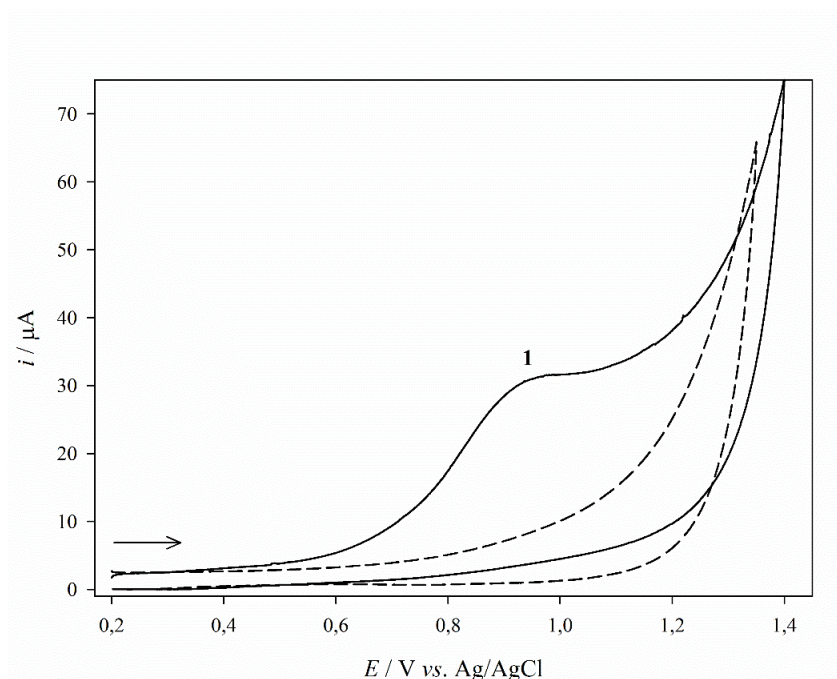
elektrolitu ne može doći do prijelaza elektrona. Naknadno je β -karoten razrijeđen sepiolitom te se na slici 4.16. može vidjeti odziv smjese β -karoten:sepiolit (1:1, w/w) s jednim širim strujnim valom 1 (crvena linija).

Na slici 4.17. prikazan je ukupan odziv struje te početna i povratna komponenta struje dobivenih pravokutnovalnom voltametrijom smjese mikrokristala β -karotena i sepiolita (1:1, w/w). Dobiven je SWV odziv širokog raspona s maksimumom na potencijalu od 0,88 V. Obje komponente ukupne struje, i početna i povratna komponenta, su oksidacijske struje. To upućuje da je prijenos naboja ireverzibilan proces. Nadalje je utvrđeno da je potencijal pozitivniji ako frekvencija raste što je također u skladu s ireverzibilnim procesom. Prikazom ovisnosti ukupnih vršnih potencijala s logaritmom frekvencije u rasponu između 10 Hz i 1000 Hz dobivena je linearna ovisnost s nagibom od 0,0752 V / d.u. Prema teoriji²⁴⁰, ovaj nagib ovisi o koeficijentu prijenosa elektrona i broju elektrona koji sudjeluju u reakciji na elektrodi: $\Delta E_p / \Delta \log f = 2,3RT/2\alpha nF$ i nakon izračuna dobiva se $\alpha n = 0,39$.



Slika 4.17. Pravokutnovalni voltamogram mikrokristala smjese β -karoten:sepiolit (1:1,w/w) imobilizirane na površinu PIGE i uronjene u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 25$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV. Na slici su prikazani strujni val 1 i ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

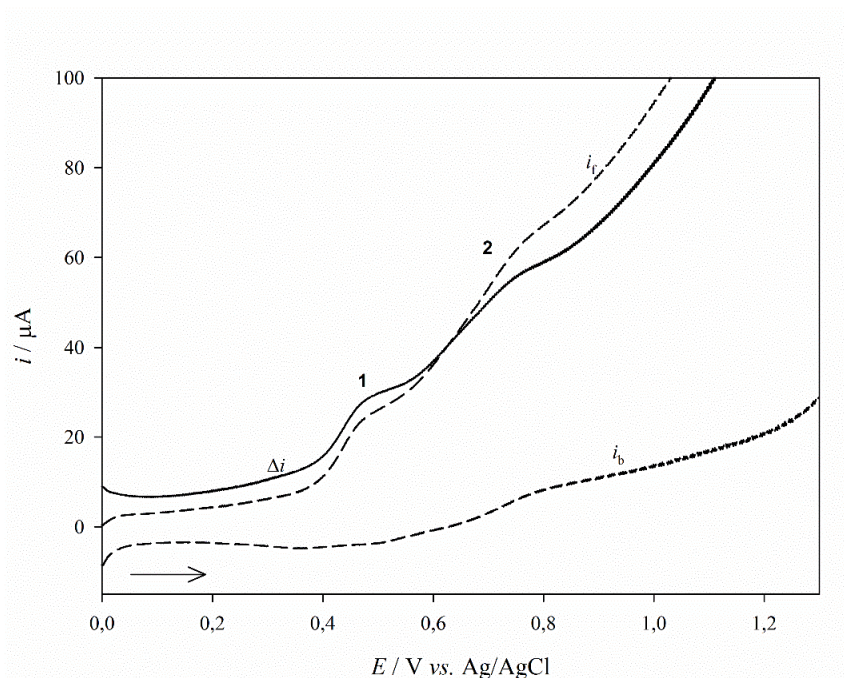
Na slici 4.18. prikazani su voltamogrami dobiveni cikličkom voltametrijom za mikrokristale smjese β -karoten:sepiolit (1:1, w/w) imobilizirane na PIGE i uronjene u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄, pH 1,5. Kod brzine 0,1 V s⁻¹ ciklički voltamogram oksidacije β -karotena sastoji se od jednog razvučenog vala s maksimumom pri potencijalu od 0,92 V (3 mol dm⁻³ KCl), što je u skladu s potencijalom vrha 1 utvrđenim primjenom SWV. Vrijednost ovog potencijala je nešto viša od vršnih potencijala dobivenih za samostalne monoslojeve karotenoida (0,8 V).²¹³ Iz dobivenih odziva, može se uočiti oksidacijski val, međutim na katodnoj grani voltamograma nije detektiran niti jedan redukcijski val. Ovo je pokazatelj da se produkti oksidacije β -karotena ireverzibilno gube. Potencijal oksidacije β -karotena se linearno povećava s logaritmom brzine promjene potencijala ($10 \text{ mV s}^{-1} < v < 1000 \text{ mV s}^{-1}$), što je karakteristično za kinetički kontrolirane procese. Treba napomenuti da je vrijednost $\alpha n = 0,44$, dobivena iz nagiba ovisnosti potencijala s logaritmom brzine promjene potencijala, u skladu s rezultatima pravokutnovalne voltametrije. Budući da mogući nastali kationski radikal nije stabilan u vodi²⁰⁹, ovi se odzivi mogu pripisati elektrodnim reakcijama koje uključuju izmjenu dva elektrona i u reakciji s vodom daju epoksidge.²⁴¹ Nadalje je moguće da se ti produkti mogu podijeliti u aldehide.²⁴²



Slika 4.18. Ciklički voltamogrami mikrokristala smjese β -karoten:sepiolit (1:1,w/w) (puna linija) imobilizirane na površinu PIGE i prazne elektrode (isprekidana linija) uronjenih u vodenu otopinu 0,1 mol dm⁻³ HClO₄. Ostali eksperimentalni uvjeti: $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$.

4.2.1.2. Voltametrija imobiliziranog mikrofilma β -karotena

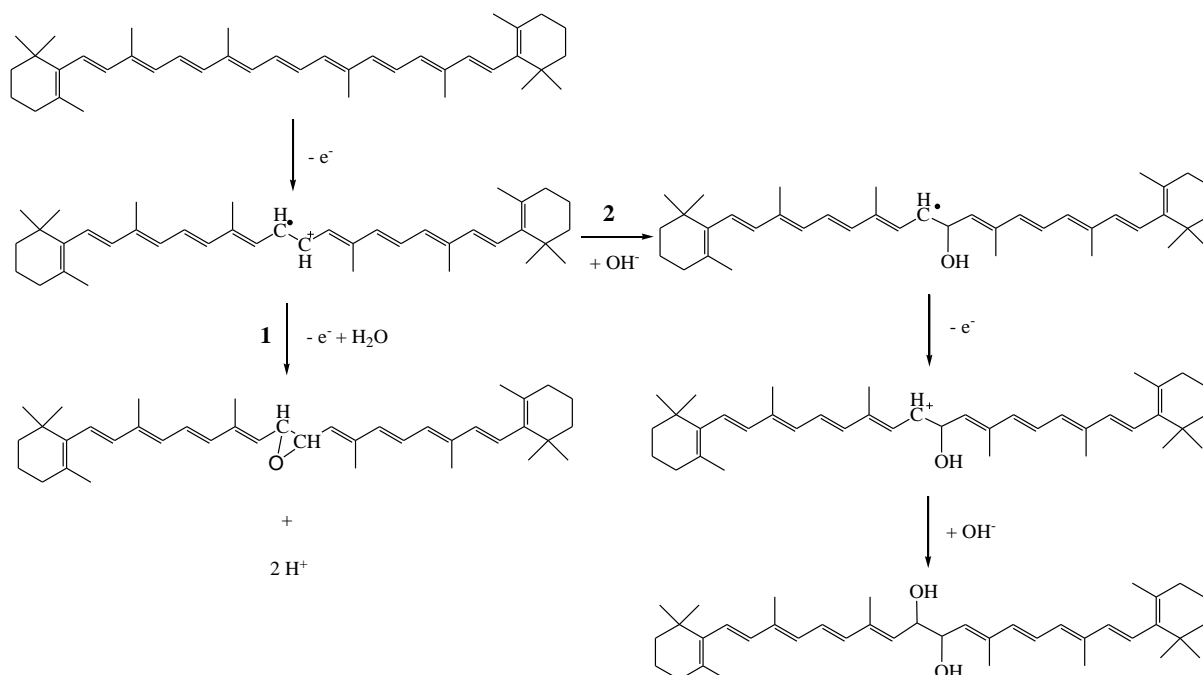
Elektrokemijska svojstva otopljenog β -karotena ispitivana su i primjenom voltametrijske tehnike koja omogućuje direktnu analizu organskih otopina lipofilnih molekula u vodenom elektrolitu. Provedena je pravokutnovalna voltametrija jer se pokazala osjetljivijom tehnikom od cikličke voltametrije prilikom analize karotenoida. β -Karoten je otopljen u acetonu, s maksimalnom koncentracijom od $3,26 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s obzirom da je maksimalna topljivost β -karotena u acetonu 200 mg dm^{-3} .⁹⁶ Aceton je odabran kao otapalo zbog niske točke vrelišta (56°C) pa brzo isparava na površini elektrode što je također prednost zbog osjetljivosti ispitivanih spojeva na visoku temperaturu i kisik. Nadalje, aceton se pokazao kao jedan od najboljih spojeva za ekstrakciju karotenoida²⁴³, a ujedno je i manje toksičan za razliku od nekih drugih organskih otapala.



Slika 4.19. Pravokutnovalni voltamogram precipitiranog mikrofilma β -karotena, koncentracije $3,26 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ imobiliziranog na PIGE i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 1 i 2, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_i) i povratna (i_b) komponenta struje.

Pravokutnovalni voltamogram dobiven za otopinu β -karotena, koncentracije $3,26 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ nanošenjem $5 \text{ }\mu\text{L}$ na površinu parafinom impregnirane grafitne elektrode (PIGE) te isparavanjem otapala do nastanka mikrofilma analita prikazan je na slici 4.19. Karakteriziran je sa dva sukcesivna široka vala. Vršni potencijal vala 1 je pri $0,477 \text{ V}$, dok je vršni potencijal vala 2 oko 250 mV pozitivniji, pri $0,725 \text{ V}$. Niti za jedan oksidacijski val ne može se primijetiti redukcijski val u povratnoj komponenti struje, što odgovara ireverzibilnom elektrokemijskom procesu.

Dva oksidacijska odziva imobiliziranog mikrofilma β -karotena, mogu se objasniti dvjema reakcijskim putovima. Prvo objašnjenje pretpostavlja da se prvi odziv može pripisati formiranju radikal kationa, a drugi odziv formiranju epoksida (slika 4.20. (1)). Druga je pretpostavka da primarni produkt, radikal kation, veže hidroksilnu skupinu (OH^-) iz vode na pozitivno mjesto u molekuli čime nastaje alil radikal, a daljnjim prijenosom elektrona (slika 4.19., val 2) nastaje karbokation koji na sebe veže drugu OH^- skupinu (slika 4.20. (2)). Drugi reakcijski put je u ovom slučaju vjerojatniji, s obzirom na eksperimentalne uvjete, odnosno upotrebu vodenog elektrolita, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ u kojem epoksid hidrolizira u diol. Ovakav rezultat može se objasniti tragovima molekula acetona u mikrofilmu koje solvativiraju β -karoten i omogućuju stvaranje relativno stabilnog radikal kationa. Kod mikrokristala β -karotena ove stabilizacije nema pa se javlja jedan dvoelektronski odziv kod znatno višeg potencijala. Prema literaturi, elektrooksidacijom β -karotena u organskim otapalima nastaje jedan reverzibilni²⁰⁷ ili kvazireverzibilni odziv²⁰². To znači da se reakcije nastanka kation radikala i dikationa zbivaju gotovo istovremeno te dolazi do prijenosa dva elektrona u jednom koraku. Hapiot i sur.²⁰⁷ ovakav mehanizam objašnjavaju inverzijom standardnih potencijala zbog koje je drugi prijelaz elektrona lakši od prvog.



Slika 4.20. Predloženi reakcijski mehanizmi elektrokemijske oksidacije β -karotena.

Kako bi se ispitala analitička primjenjivost prikazane metode, konstruirane su kalibracijske krivulje za sve karotenoide ispitivane u ovom radu, dakle za β -karoten, lutein te astaksantin pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima (objašnjeno u poglavlju 4.2.3.). Za karotenoide lutein i astaksantin, kalibracijske krivulje prikazane su dalje u radu.

Kalibracijske krivulje za β -karoten konstruirane su za oba dobivena vala. Mjerenje je provedeno za relativno uzak raspon koncentracija β -karotena, od $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3,26 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, a odgovarajuće ovisnosti vršnih struja za val 1 i val 2 o koncentraciji analita prikazane su na slici 4.21. (A) i (B). Ispod najniže navedene koncentracije, nije bilo voltametrijskih odziva. Primijenjena metoda pokazala je linearan odziv u rasponu koncentracija β -karotena za val 1 koje su ispitivane, dakle od $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3,26 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije od 0,980, dok je za val 2 linearan odziv bio u nešto užem rasponu, od $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije 0,972. Prilikom promjene koncentracija, primijećeno je da s povećanjem koncentracije, val 1 postaje sve izraženiji, dok je kod manjih koncentracija slabije izražen. Iznad koncentracije $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ vršna struja vala 2 je do dva puta viša od vršne struje vala 1, dok je ispod te koncentracije, vršna struja vala 1 oko 0,5 puta viša od vršne struje vala 2. Ovakva promjena može se primijetiti iz nelinearne

ovisnosti vršne struje sa koncentracijom vrha 2 prikazane na slici 4.21. (B) iznad koncentracije $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Validacijom metode za oba vrha, vrh 1 i vrh 2, dobiveni su različiti rezultati.

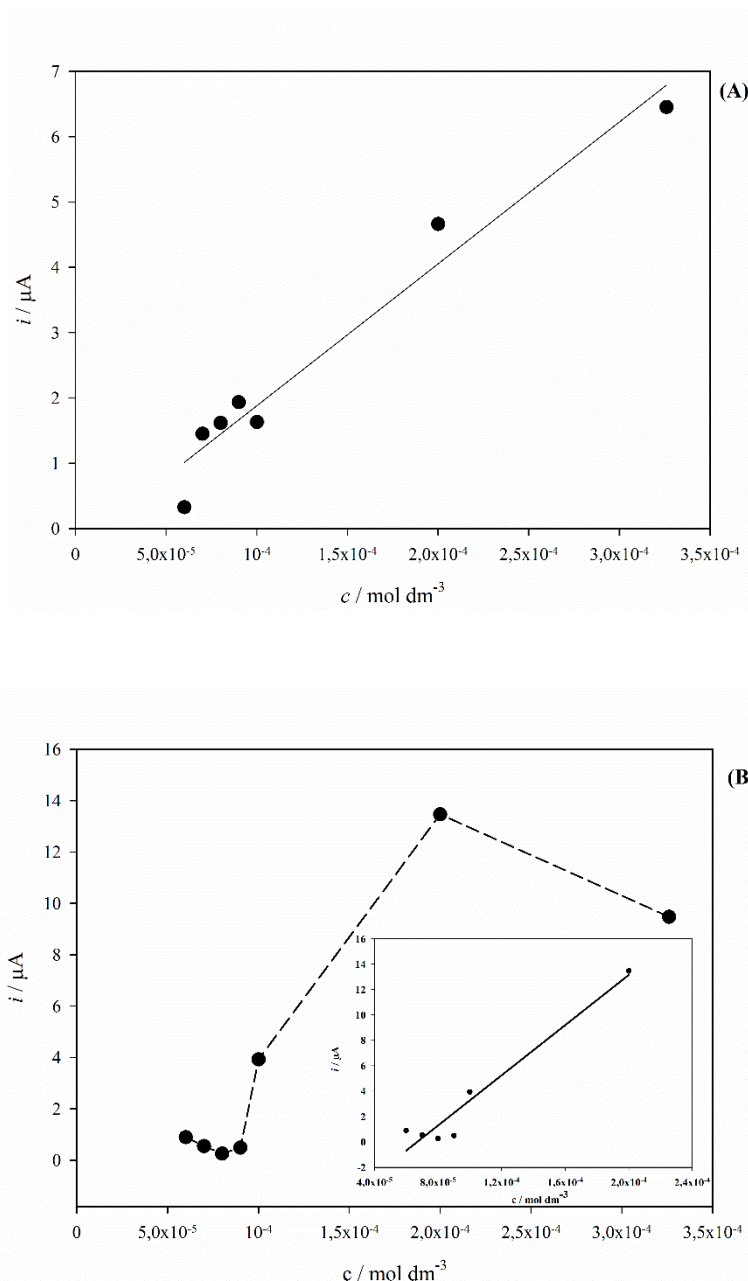
Također, treba uzeti u obzir i prethodno provedenu tehniku, voltametriju imobiliziranih mikrokristala, kojom je vidljiv samo vrh 2 pri nešto višem potencijalu od 0,88 V (slika 4.17.). Iako je ta tehnika korištena isključivo u kvalitativne svrhe, usporedbom rezultata dobivenih i voltametrijom imobiliziranog mikrofilma β -karotena, dobiva se uvid u elektrokemijsku oksidaciju ovog spoja.

Točnost metode određena je za oba vala, val 1 i 2 preko postotka iskorištenja (engl. *recovery*), a definira se kao stupanj podudarnosti između stvarne, odnosno referentne vrijednosti za količinu nekog analita i srednje vrijednosti količine dobivene nekom analitičkom metodom na temelju kalibracijskog pravca.²⁴⁴ Postotak iskorištenja, uzimajući u obzir val 1, iznosi 98,0 % sa standardnom devijacijom od 26,78 %, dok je za vrh 2 jednak 100,92 % sa standardnom devijacijom od 16,38 %. Ovakvi rezultati ukazuju da je strujni val 2 bolji indikator za daljnje određivanje β -karotena u realnim uzorcima morskih organizama. Iako je standardna devijacija za strujni val 2 visoka, prema literaturi²⁴⁵ ona je unutar granica prihvatljivosti za vrijednosti standardne devijacije metoda za određivanje sadržaja analita u biološkim uzorcima ($SD \leq 20 \%$). Dobivene visoke vrijednosti standardnih devijacija vršnih struja uobičajene su u stacionarnim elektrokemijskim mjerenjima uz korištenje grafitne elektrode. Valja napomenuti, da je prije svakog mjerenja, PIGE ručno čišćena, polirana te je obnovljena čista površina radne elektrode.

Relativne standardne devijacije vršnih potencijala za valove 1 i 2 su jednake 5,47 % i 1,17 %, što ukazuje na nekontaminiranost površine radne elektrode i visoku ponovljivost u identifikaciji oksidacijskih valova, s time da je dobivena niža vrijednost odstupanja za vrh 2.

Nadalje, određene su granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za oba odziva, odnosno val 1 i val 2. Granica detekcije (LOD) definira se kao najmanja količina analita u uzorku koja se još može detektirati primjenom neke analitičke metode, a određuje se na bazi standardne devijacije svake kalibracijske krivulje i nagiba kalibracijskog pravca ($LOD = 3 s_a/b$), dok se granica kvantifikacije (LOQ) definira kao najmanja količina analita u uzorku koja se još može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost, a određena je na bazi standardne devijacije svake kalibracijske krivulje i nagiba kalibracijskog pravca ($LOQ = 10 s_a/b$).²⁴⁴ Kao što je ranije spomenuto, ispitan je uzak raspon koncentracija te su granice detekcije za val 1 i 2 jednake $1,50 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ i $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dok granice kvantifikacije iznose $4,56 \cdot 10^{-4}$

4 mol dm^{-3} i $3,51 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. I ovdje se može primijetiti da su obje granice nešto niže za vrh 2.

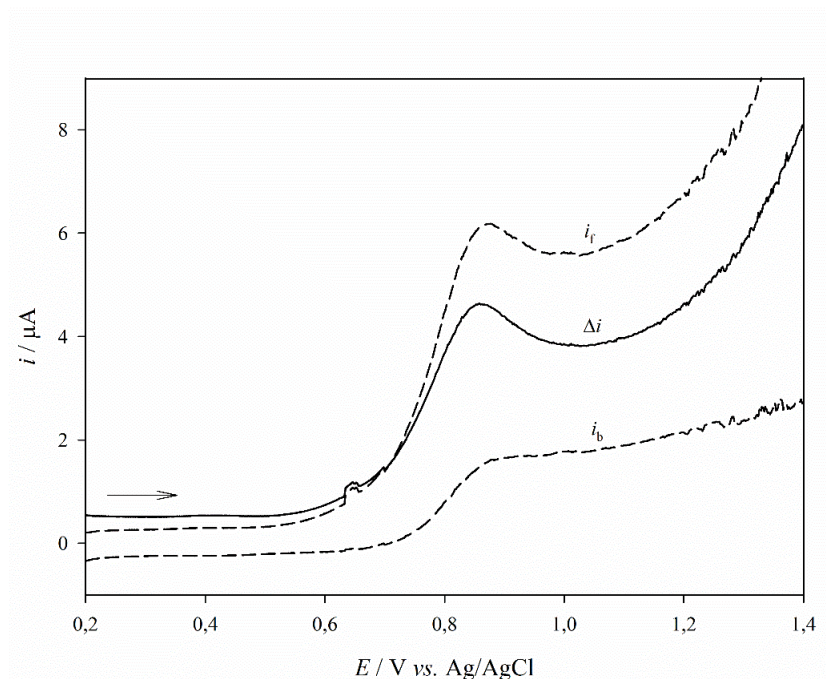


Slika 4.21. Ovisnost vršnih struja valova 1 (A) i 2 (B) precipitiranog mikrofilma β -karotena na PIGE o koncentraciji. Umetak pokazuje ovisnost vršne struje (Δi) o koncentraciji u užem rasponu. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.19.

Osim mjerenja na PIGE, voltametrijska analiza β -karotena provedena je i na ručno izrađenoj elektrodi od ugljikove paste (mCPE). Detaljan opis izrade mCPE objašnjen je u poglavlju 3.2.1.2. (str. 42). Uvjeti analize na ovoj elektrodi jednaki su uvjetima na PIGE, međutim s obzirom da je smanjena aktivna površina same elektrode sa 5 mm na 0,1 mm, volumen otapala koji se nanosi na površinu elektrode smanjen je sa 5 μL na 1 μL . Već s ovim korakom, znatno je smanjen volumen korištenog otapala, a dalje u tekstu je objašnjen utjecaj na osjetljivost tehnike.

Na slici 4.22. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za otopinu β -karotena, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ i volumena od 1 μL na površinu mCPE te isparavanjem otapala do nastanka mikrofilma β -karotena. Može se primijetiti jedan dobro definirani val 2 s vršnim potencijalom pri 0,857 V. Promjena elektrode nije utjecala na reverzibilnost elektrokemijske reakcije, odnosno ni ovdje se na povratnoj komponenti ne može primijetiti redukcijski val, što odgovara ireverzibilnom elektrokemijskom procesu. Međutim, uočeno je da se SWV voltamogram snimljen na mCPE razlikuje od voltamograma snimljenog na PIGE. SWV odziv β -karotena snimljen na mCPE sastoji se od samo jednog strujnog vala, prije spomenutog vala 2, s vršnim potencijalom od 0,857 V koji je oko 100 mV pozitivniji u odnosu na potencijal vala 2 dobivenog na PIGE, ali je sličan valu oksidacije mikrokristala β -karotena. Reakcijski mehanizam oksidacije β -karotena na mCPE može se objasniti shemom (2) na slici 4.20., ali je očito da je radikal kation jako nestabilan. Zbog toga je prisutan samo jedan dvoelektronski val koji odgovara nastanku β -karoten alil kationa koji dalje reagira sa hidroksilnim skupinama vode i daje diol. Ovaj rezultat pokazuje da stabilnost radikal kationa ne zavisi samo o tragovima acetona u precipitatu, nego i o karakteristikama površine elektrode.

I za ovaj sustav konstruirane su kalibracijske krivulje, odnosno na slici 4.23. prikazana je ovisnost promjene vršne struje s promjenom koncentracije. Mjerenja su provedena u rasponu od $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ te se već po tome može vidjeti da je mCPE nešto osjetljivija elektroda od PIGE. Linearna ovisnost dobivena je u rasponu koncentracija od $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije $r = 0,985$. Iako je na mCPE došlo do pomaka prema nižim ispitivanim koncentracijama, daljnjim povećanjem koncentracije β -karotena ($> 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) strujni odziv vala 2 ne mijenja se linearno s koncentracijom analita jer dolazi do zasićenja površine elektrode kao i kod PIGE (slika 4.21. (B)) te su vršne struje u oba slučaja manje, nego što bi to teoretski trebale biti.

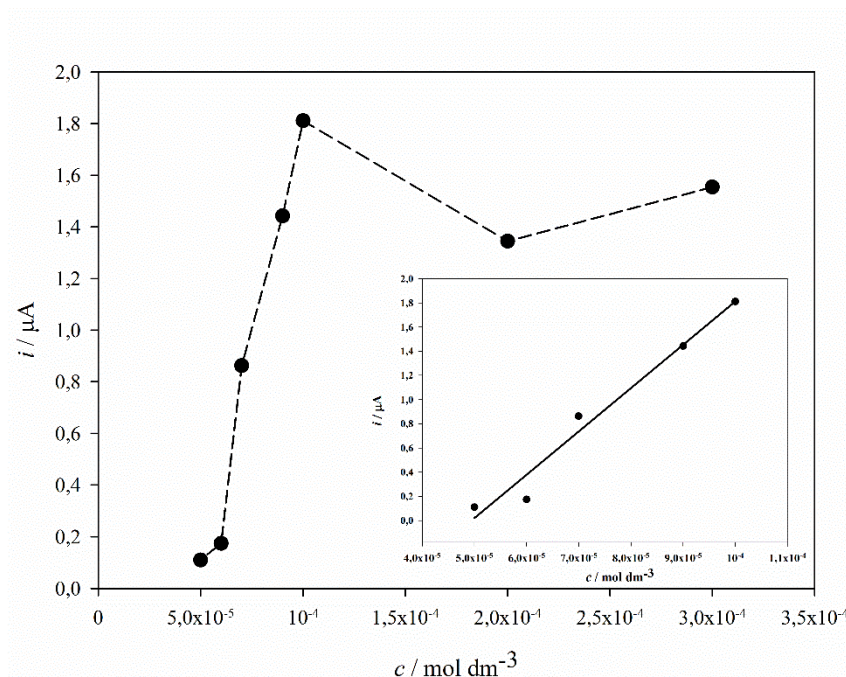


Slika 4.22. Pravokutnovalni voltamogram mikrofilma β -karotena, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , imobiliziranog na mCPE i uronjenog u $0,1$ mol dm^{-3} HClO_4 . Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100$ Hz, $E_{\text{sw}} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV. Na slici su prikazani strujni val 2, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Provedbom mjerenja na mCPE, čija je radna površina 600 puta manja od površine PIGE, dobiven je oksidacijski val na potencijalu ($E_{p,1} = 0,857$ V) koji je gotovo jednak potencijalu na kojem je dobiven oksidacijski val voltametrijom imobiliziranih mikrokristala ($E_{p,1} = 0,880$ V), no ipak je strujni val dobiven pravokutnovalnom voltametrijom na mCPE izraženiji i bolje definiran od odziva dobivenog na mikrokristalima β -karotena. Unatoč tome, provedbom ovih tehnika na elektrodama različite vrste i veličine, osim uvida u elektrokemijski mehanizam oksidacije β -karotena, dobiva se i potvrda o ponovljivosti i točnosti elektrokemijskih mjerenja ove izrazito lipofilne molekule u vodenom elektrolitu.

Daljnjom analitičkom obradom dobivenih rezultata na mCPE, određen je postotak iskorištenja, odnosno točnost metode, koji je iznosio 100,04 % sa standardnom devijacijom od 5,92 %. Usporedbom standardne devijacije rezultata dobivenih na PIGE za β -karoten imobilizirani mikrofilm, može se vidjeti koliko je voltometrija imobiliziranog mikrofilma na mCPE reproducibilnija tehnika u analizi β -karotena.

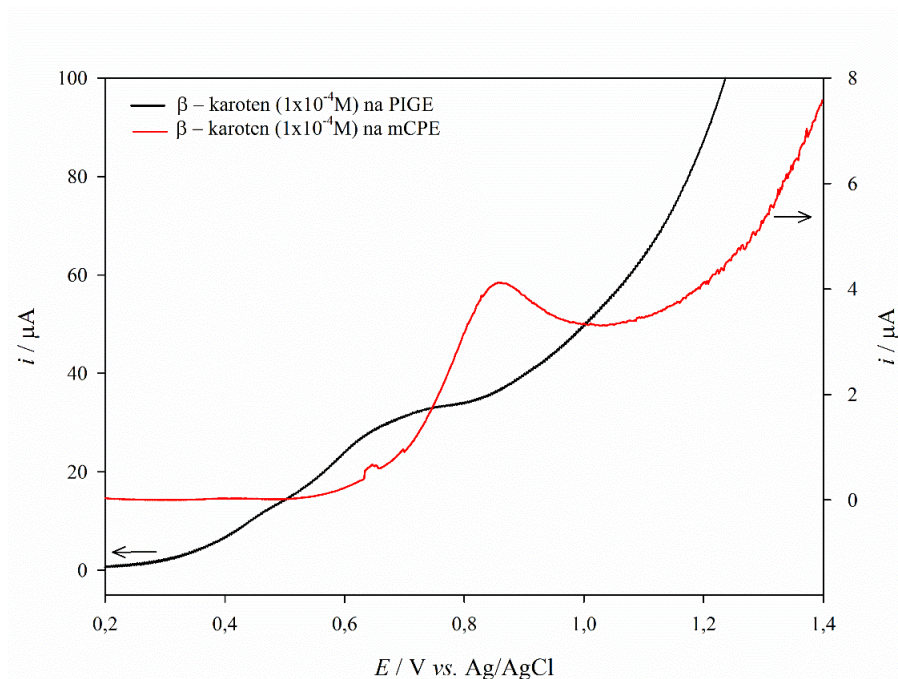
Relativna standardna devijacija vršnih potencijala za val 1 jednaka je 0,95 %, dakle manje od 1 % što ukazuje na nekontaminiranost površine radne elektrode i visoku ponovljivost u identifikaciji oksidacijskog vala. Ova vrijednost je isto manja od vrijednosti dobivene na PIGE, što ukazuje na to da je tehnika na mCPE pokazala veću ponovljivost u analizi ovog karotenoida.



Slika 4.23. Ovisnost vršnih struja vala 2 precipitiranog filma β -karotena na mCPE o koncentraciji. Umetak na slici: linearna ovisnost vršne struje (Δi) o koncentraciji. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.22.

Na kraju su određene granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za val 2 koje su se pokazale nešto nižima od onih izračunatih na PIGE elektrodi. Granica detekcije za val 2 iznosi $5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je granica kvantifikacije $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Na slici 4.24. prikazani su pravokutnovalni voltamogrami oksidacije β -karotena, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ na obje elektrode, PIGE i mCPE, pri istim eksperimentalnim uvjetima te se može vidjeti razlika u elektrokemijskom odzivu ovisno o vrsti i veličini elektrode.



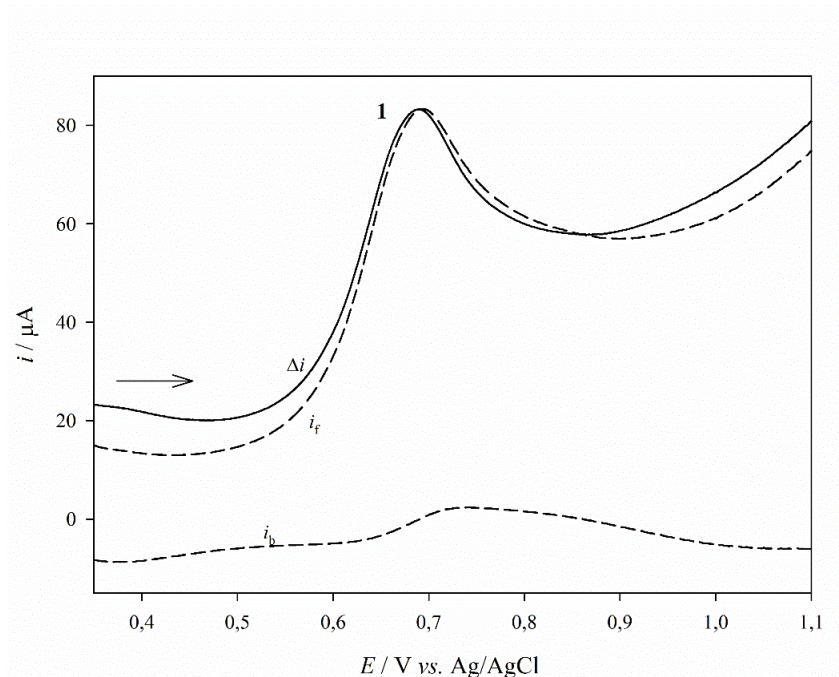
Slika 4.24. Pravokutnovalni voltamogrami oksidacije β -karotena, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, imobiliziranog na PIGE (crna linija) i na mCPE (crvena linija) i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.22.

4.2.2. Lutein

Lutein (strukturna formula na slici 2.3. (B), str. 20) drugi je iz skupine karotena istraživanih u sklopu ovog rada. Lutein i njegov izomer zeaksantin, jedina su dva karotenoida koji se nalaze u oku, točnije žutoj pjegi ili makuli te ju štite od oštećenja uzrokovanih fotooksidativnim učincima ili UV plavim svjetlom.¹¹³ Pregledom literature nađen je mali broj radova koji se bave problematikom elektrooksidacije luteina, a oni autori koji su radili njegovu elektrokemijsku karakterizaciju provodili su je u organskim otapalima.²¹⁰

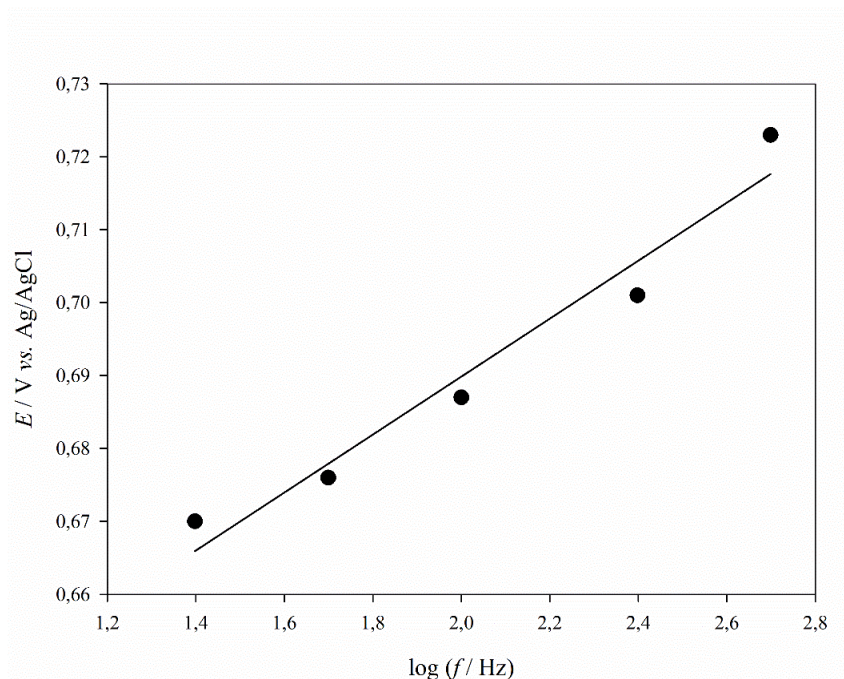
U ovome radu voltametrijsko ponašanje luteina u vodenom elektrolitu ispitivano je primjenom pravokutnovalne voltametrije na imobilizirane mikrokristale, mikrofilm te mikrokap, međutim rezultati su dobiveni samo za mikrofilm luteina imobiliziranog na PIGE što je prikazano u nastavku.

4.2.2.2. Voltametrija imobiliziranog mikrofilma luteina



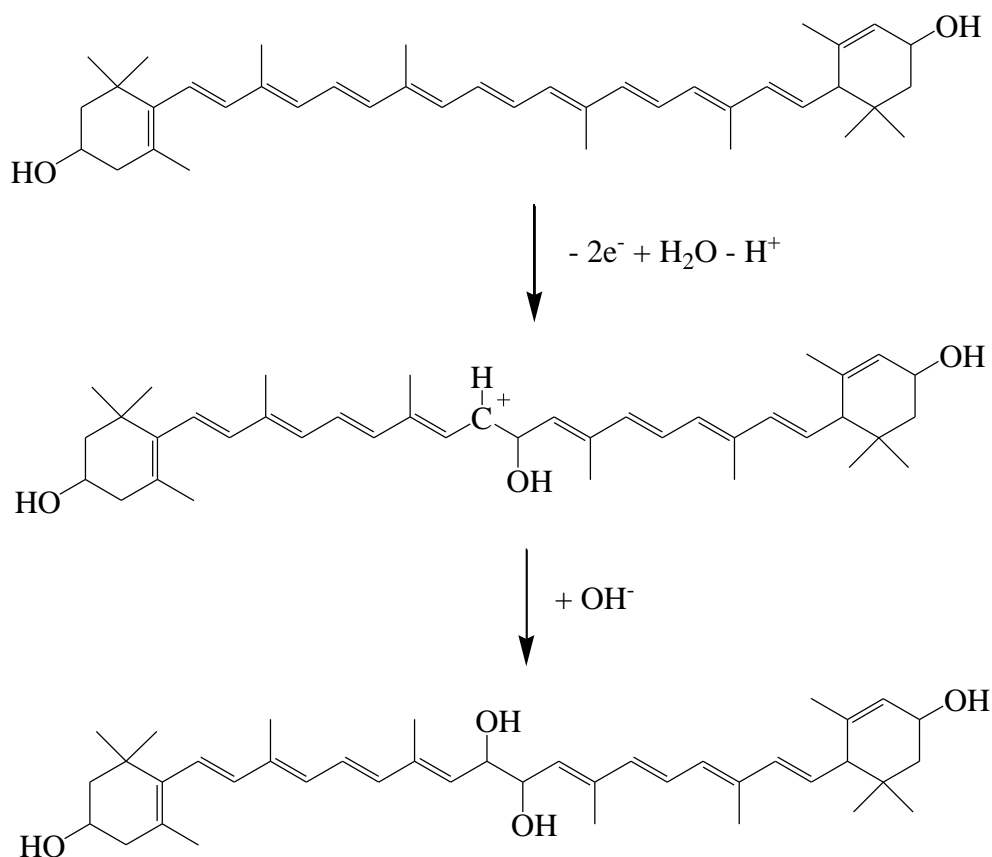
Slika 4.25. Pravokutnovalni voltamogram precipitiranog mikrofilma otopine luteina, koncentracije $1,32 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ imobiliziranog na PIGE i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ otopinu. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni val 1, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Voltamogram imobiliziranog mikrofilma luteina dobiven u području potencijala od $0,3 \text{ V}$ do $1,1 \text{ V}$ pomoću pravokutnovalne voltametrije na PIGE koja je uronjena u vodenu otopinu $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ prikazan je na slici 4.25. S obzirom da je maksimalna topljivost luteina u acetonu 800 mg dm^{-3} ⁹⁶, pripremljena je otopina koncentracije $1,38 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ te su snimljeni odzivi u širokom rasponu potencijala, od $-0,5 \text{ V}$ do $1,2 \text{ V}$. Primjenom frekvencije od 100 Hz , dobiven je jedan dobro izražen anodni val 1 s vršnim potencijalom pri $0,687 \text{ V}$ *versus* $\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$. Redukcijski val nije zabilježen na povratnoj komponenti struje što odgovara ireverzibilnom elektrokemijskom procesu. Ireverzibilnost procesa potvrđena je slikom 4.26. gdje je prikazana ovisnost vršnog potencijala o logaritmu frekvencije. Vršni potencijal linearno raste u rasponu frekvencija od 25 Hz do 500 Hz frekvencije s nagibom od $0,059 \text{ mV/d.u}$ iz kojeg je izračunat produkt $\alpha n = 0,49$.



Slika 4.26. Ovisnost vršnog potencijala vala 1 precipitiranog mikrofilma luteina, koncentracije $1,32 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, o logaritmu frekvencije. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.25.

Na temelju dobivenih rezultata predlaže se da reakcijski put luteina (slika 4.27.) uključuje formiranje radikal kationa kao primarnog produkta prvog prijenosa elektrona, ali se ovaj korak zbiva gotovo istovremeno s drugim korakom u kojemu je, zbog prisutnosti vode u sustavu, došlo do vezanja hidroksilne skupine (OH^-) na pozitivno mjesto u molekuli i nastanka alil radikala koji daljnjim prijenosom elektrona daje karbokation koji onda na sebe veže drugu OH^- skupinu i daje diol.²⁰⁹

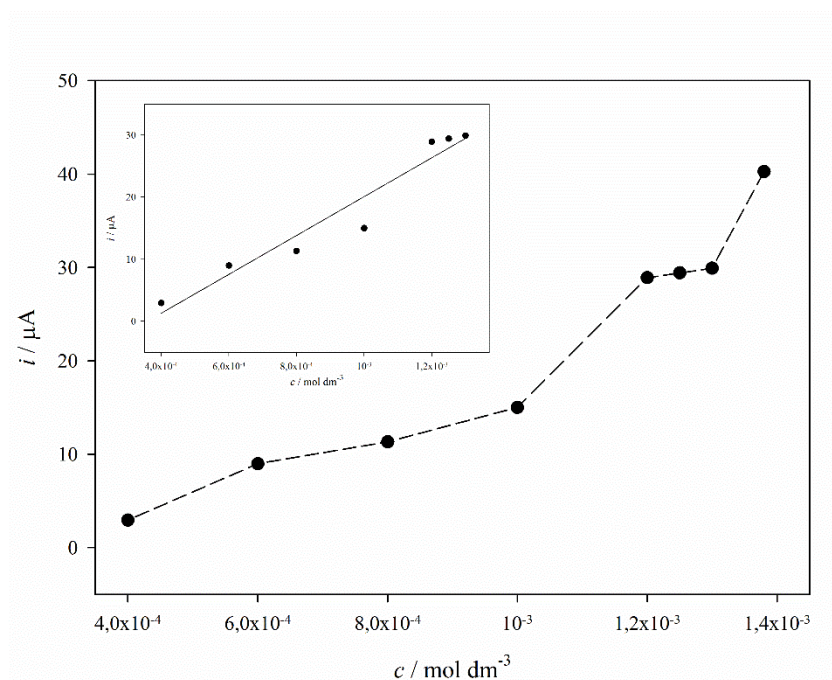


Slika 4.27. Predloženi reakcijski mehanizam elektrokemijske oksidacije luteina.

Odnos između vršnih struja i koncentracije luteina u obliku precipitata, odnosno kalibracijska krivulja konstruirana je u svrhu dobivanja analitičkih podataka. Mjerenje je provedeno za raspon koncentracija luteina od $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $1,38 \text{ mmol dm}^{-3}$, a odgovarajuće ovisnosti vršnih struja za val 1 mikrofilma luteina o koncentraciji prikazane su na slici 4.28. Primijenjena metoda pokazala je linearan odziv u rasponu koncentracija od $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $1,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije $r = 0,969$.

Točnost metode izražena je preko postotka iskorištenja vala 1 koji iznosi 99,6 % sa standardnom devijacijom od 12,13 %. Ovakva standardna devijacija je unutar granica prihvatljivosti za vrijednosti standardne devijacije metoda koje se koriste za određivanje sadržaja analita u biološkim uzorcima ($SD \leq 20 \%$).²⁴⁵

Relativna standardna devijacija vršnih potencijala za val 1 jednaka je 0,768 %, što ukazuje na nekontaminiranost površine radne elektrode i visoku ponovljivost u identifikaciji oksidacijskog vala.



Slika 4.28. Ovisnost vršnih struja vala 1 precipitiranog mikrofilma luteina na PIGE o koncentraciji. Umetak na slici: linearna ovisnost vršne struje (Δi) o koncentraciji. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.25.

Određene su i granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za lutein u obliku imobiliziranog mikrofilma. Granica detekcije za val 1 jednaka je $9,84 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je granica kvantifikacije $2,98 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ što pokazuje da su navedene granice dosta visoke u odnosu na vrijednosti koje se očekuju u realnim uzorcima morskih organizama.

4.2.3. Astaksantin

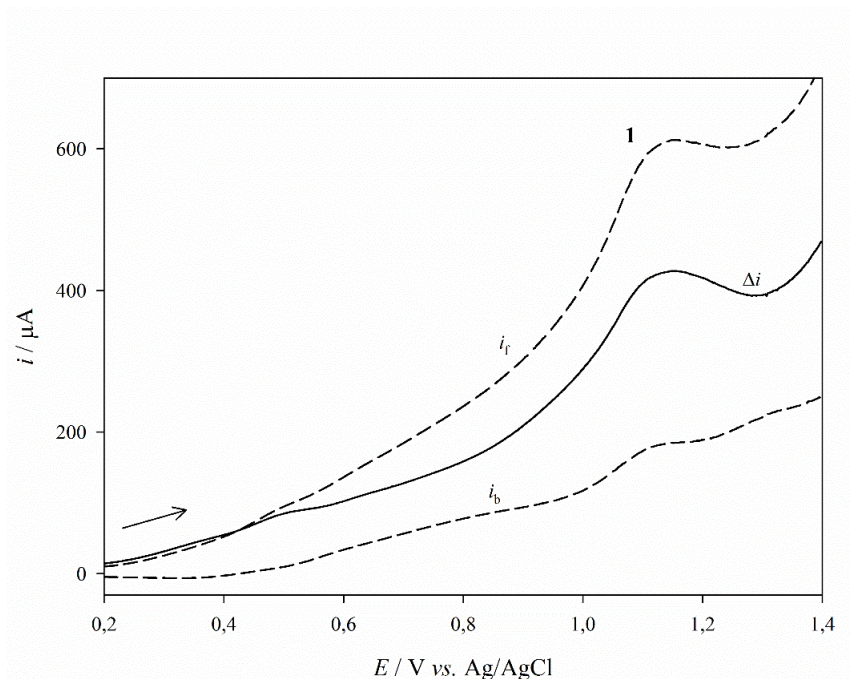
Astaksantin spada u grupu karotenoida zvanih ksantofili te je dokazano da posjeduje četrdeset puta jaču antioksidativnu aktivnost od β -karotena. Jedan je od najzastupljenijih karotenoida u morskim organizmima.²⁴⁶ Alga *Haematococcus pluvialis* je glavni prirodni izvor astaksantina²⁰⁴ te je odgovorna za pigmentaciju lososa, škampa i kozica jer im je upravo ona glavni izvor hrane.^{246,247} Prvi je komercijalno korišteni karotenoid za pigmentaciju u industrijskoj akvakulturi. Istraživanje i potražnja prirodnog astaksantina za primjenu u očuvanju ljudskog zdravlja sve više raste jer je snažan i siguran antioksidans, odnosno ne posjeduje nikakva prooksidativna svojstva. Uz to ima i superiornu poziciju unutar stanične membrane jer je smješten i u hidrofilnom i hidrofobnom dijelu fosfolipidne membrane.

Elektrokemijska analiza astaksantina dosad je provedena u organskim otapalima (kloroformu²⁴⁸ i diklormetanu²⁰⁴). U najnovijem istraživanju iz 2016. godine, Oliveira i suradnici²¹² elektrokemijsku su ispitivali astaksantin u otopini aceton:diklormetan:voda u omjerima 80:10:10 (w/w) s time da je pripremljena otopina astaksantina u diklormetanu.

S obzirom na literaturne podatke da morski organizmi akumuliraju veće količine astaksantina u svojim tkivima u odnosu na biljke, u ovom je radu provedena voltametrijska analiza astaksantina u obliku mikrokristala, mikrofilma te mikrokapi. Valja napomenuti da se astaksantin pokazao elektroaktivnijim i od β -karotena i od luteina.

4.2.3.1. Voltametrija imobiliziranih mikrokristala astaksantina

Problem vezan uz direktnu detekciju β -karotena u obliku mikrokristala, odnosno nemogućnosti njegovog određivanja tom tehnikom, u analizama astaksantina se nije pojavio što se može objasniti njegovom specifičnom kemijskom strukturom. Molekula astaksantina se sastoji od dva krajnja prstena povezana polienskim lancem. Također ima dva asimetrična ugljika koja se nalaze na 3,3' poziciji β -iononskog prstena s hidroksilnom skupinom (-OH) na oba kraja molekule (strukturna formula na slici 2.3. (C), str. 20). Terminalne skupine omogućuju specifični raspored u dvostrukom sloju stanične membrane u živim organizmima i organizirane su u hidrofilnom dijelu dvostrukog sloja.²⁴⁹ Zbog takve strukture, astaksantin je elektroaktivniji u vodenom mediju te nije bilo potrebe za razrjeđivanjem smjese analita.

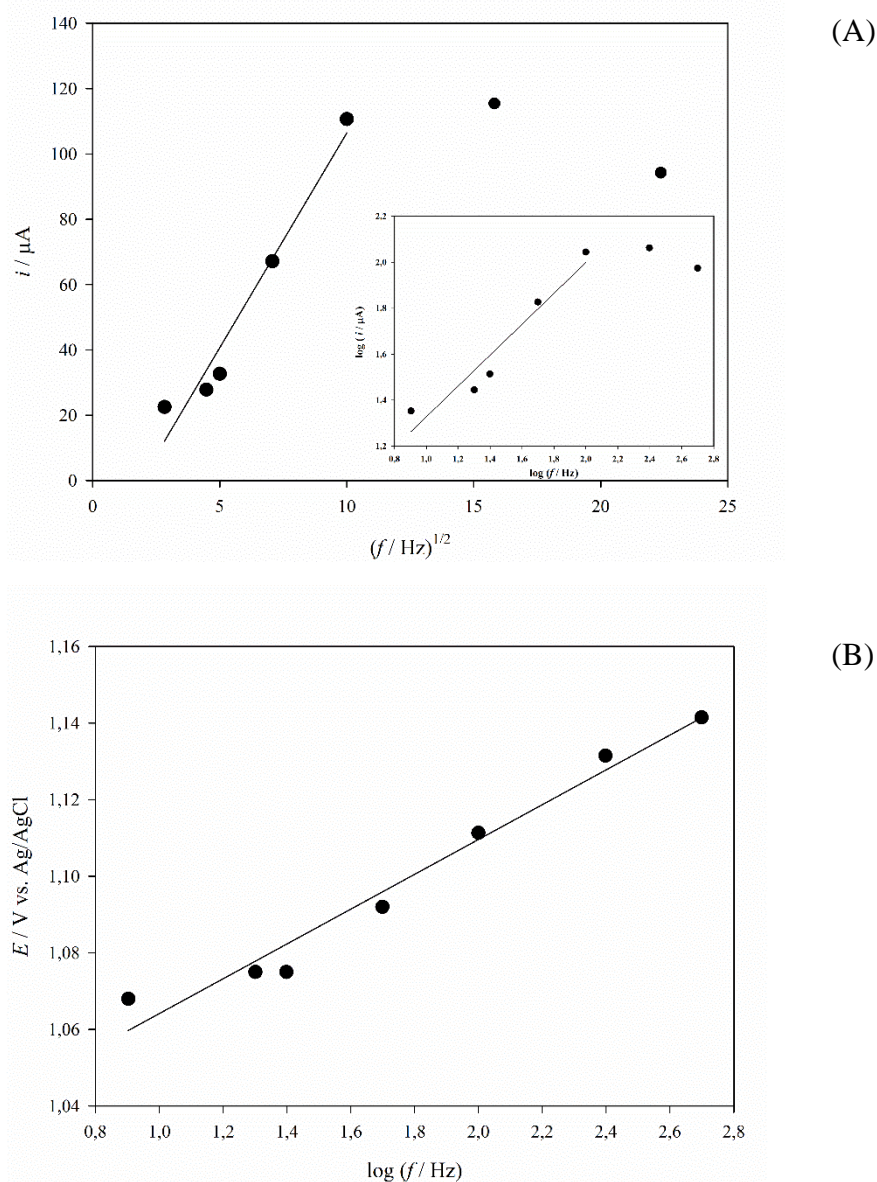


Slika 4.29. Pravokutnovalni voltamogram mikrokrstala astaksantina imobiliziranih na površini PIGE i uronjenih u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni val 1 i ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Slika 4.29. prikazuje pravokutnovalni voltamogram mikrokrstala astaksantina imobiliziranih na površini PIGE. Pravokutnovalnom voltametrijom u području od $0,2 \text{ V}$ do $1,4 \text{ V}$ može se uočiti jedan široki oksidacijski val pri vršnom potencijalu od $1,09 \text{ V}$. Valja napomenuti da je provedena oksidacija mikrokrstala od negativnijih potencijala ($-0,5 \text{ V}$), međutim nisu bili vidljivi odzivi pri nižim vrijednostima potencijala. Ukoliko je frekvencija 100 Hz , a amplituda 50 mV , vršni potencijal početne komponente je $1,11 \text{ V}$, dok na povratnoj komponenti struje nije moguće primijetiti redukcijski odziv, što upućuje na to da je i ovaj redoks proces ireverzibilan.

Vršna struja vala 1 značajno ovisi o promjeni frekvencije pobude. Analizom SW voltamograma snimljenih pri različitim frekvencijama pobude nađeno je da ovisnost ukupne vršne struje vala 1 o drugom korijenu frekvencije pobude nije linearna funkcija što je karakteristika kvazireverzibilnih i ireverzibilnih elektrokemijskih procesa.¹⁶⁰ Vršna struja vala 1 ipak linearno ovisi o drugom korijenu frekvencije ukoliko je $f \leq 100 \text{ Hz}$ što se vidi na slici 4.30. (A). Prikazivanjem logaritma vršne struje vala 1 s logaritmom frekvencije dobiva se

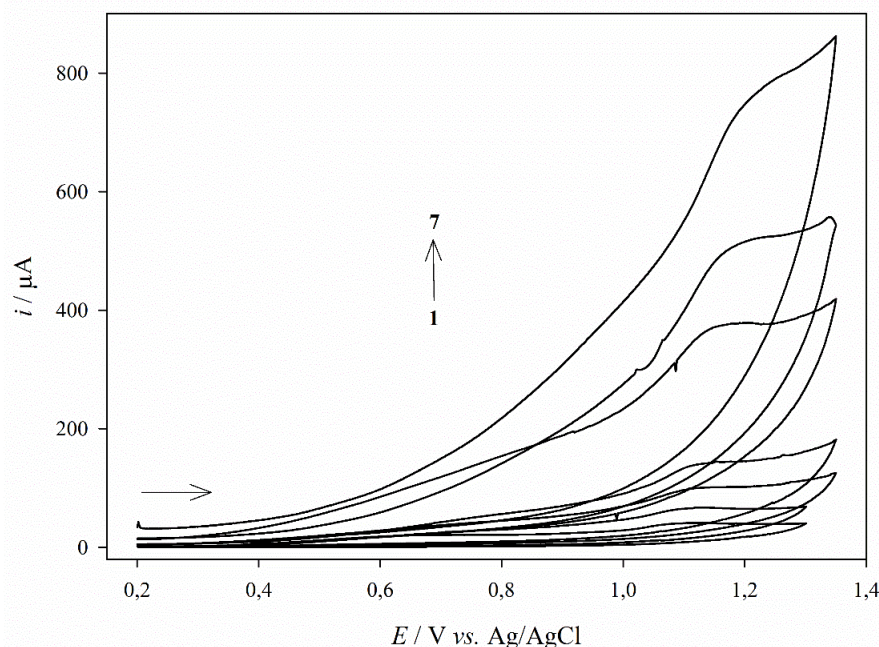
linearna ovisnost s nagibom 0,66 kad je $f \leq 100$ Hz što je nešto više od teorijske vrijednosti od 0,5 koja se očekuje kod difuzijski kontroliranih elektrodnih procesa. Može se primijetiti da je sličan trend dobiven i za mikrokristale kapsaicina imobilizirane na PIGE (slika 4.6. (A)) što upućuje da se ovakva ovisnost može objasniti modelom površinske difuzije.²²⁴



Slika 4.30. Ovisnost vršne struje vala 1 mikrokristala astaksantina o drugom korijenu frekvencije (A) i ovisnost vršnog potencijala vala 1 o logaritmu frekvencije (B). Umetak na slici A: ovisnost $\log(\Delta i)$ vs. $\log(f)$. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.29.

Linearna ovisnost vršnih potencijala vala 1 s logaritmom frekvencije u intervalu od 10 do 1000 Hz, prikazana na slici 4.30. (B), potvrđuje da se radi o ireverzibilnom procesu oksidacije mikrokristala astaksantina. Iz nagiba ovog odnosa (0,045 V / d.u.) može se izračunati vrijednost $\alpha n = 0,65$.

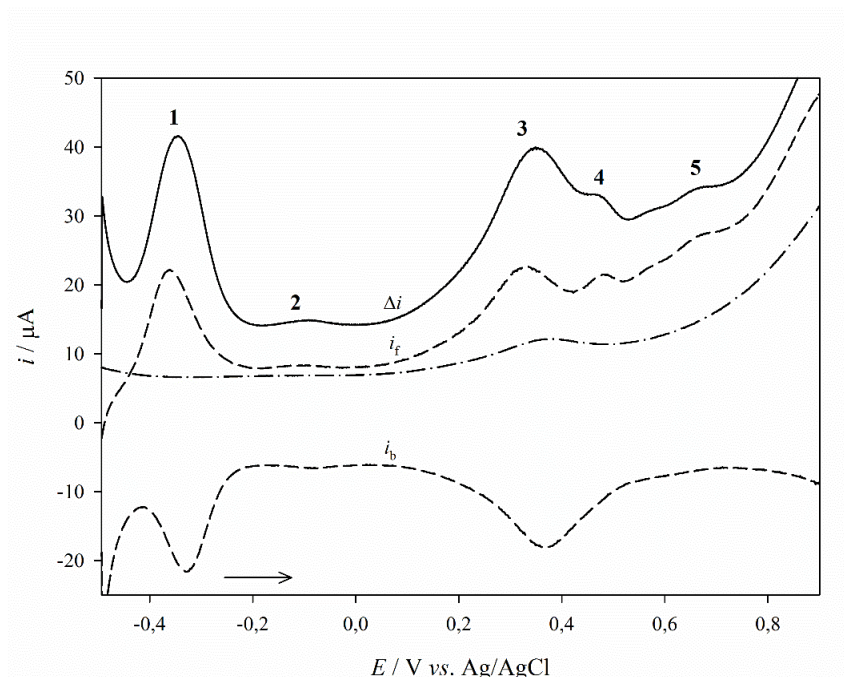
U prilog zaključku da se radi o ireverzibilnom elektrokemijskom procesu idu i rezultati dobiveni cikličkom voltametrijom za astaksantin imobiliziran na PIGE i uronjen u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄, pH 1,5 pri različitim brzinama promjene potencijala, počevši od 10 mV s⁻¹ pa do 1000 mV s⁻¹, koji su prikazani na slici 4.31. Na cikličkom voltamogramu oksidacije astaksantina uočen je jedan široki val na potencijalu od 1,16 V (3 mol dm⁻³ KCl), kad je brzina promjene potencijala 0,1 V s⁻¹, što je u skladu s rezultatima dobivenima pravokutnovalnom voltametrijom (slika 4.29.). Niti ovdje se, iz dobivenih odziva, ne može primijetiti izražen redukcijski val pa se može zaključiti da je oksidacijski proces mikrokristala astaksantina ireverzibilan. Vršni potencijali se linearno povećavaju s logaritmom brzine promjene potencijala (10 mV s⁻¹ < ν < 1000 mV s⁻¹), što je karakteristično za kinetički kontrolirane procese. Budući da ni radikal kation niti dikation nisu stabilni u vodi²⁰⁹, ovi se odzivi mogu pripisati elektrodnoj reakciji koja uključuje izmjenu dva elektrona pri čemu u reakciji s vodom nastaje diol.²⁴¹



Slika 4.31. Ciklički voltamogrami mikrokristala astaksantina imobiliziranih na površini PIGE i uronjenih u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ s porastom brzine promjene potencijala, ν , od 10 do 1000 mV s⁻¹ (1-7). Ostali eksperimentalni uvjeti: $\Delta E = 2$ mV.

4.2.3.2. Voltametrijia imobiliziranog mikrofilma astaksantina

Voltametrijia imobiliziranog mikrofilma astaksantina provedena je pri istim uvjetima kao i za β -karoten i lutein, samo u širem području potencijala, počevši od -0,9 V do 1,2 V. Provedena je pravokutnovalna voltametrijia na uzorku astaksantina otopljenog u acetonu s maksimalnom koncentracijom od $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ jer je maksimalna topljivost astaksantina u acetonu 800 mg dm^{-3} .⁹⁶

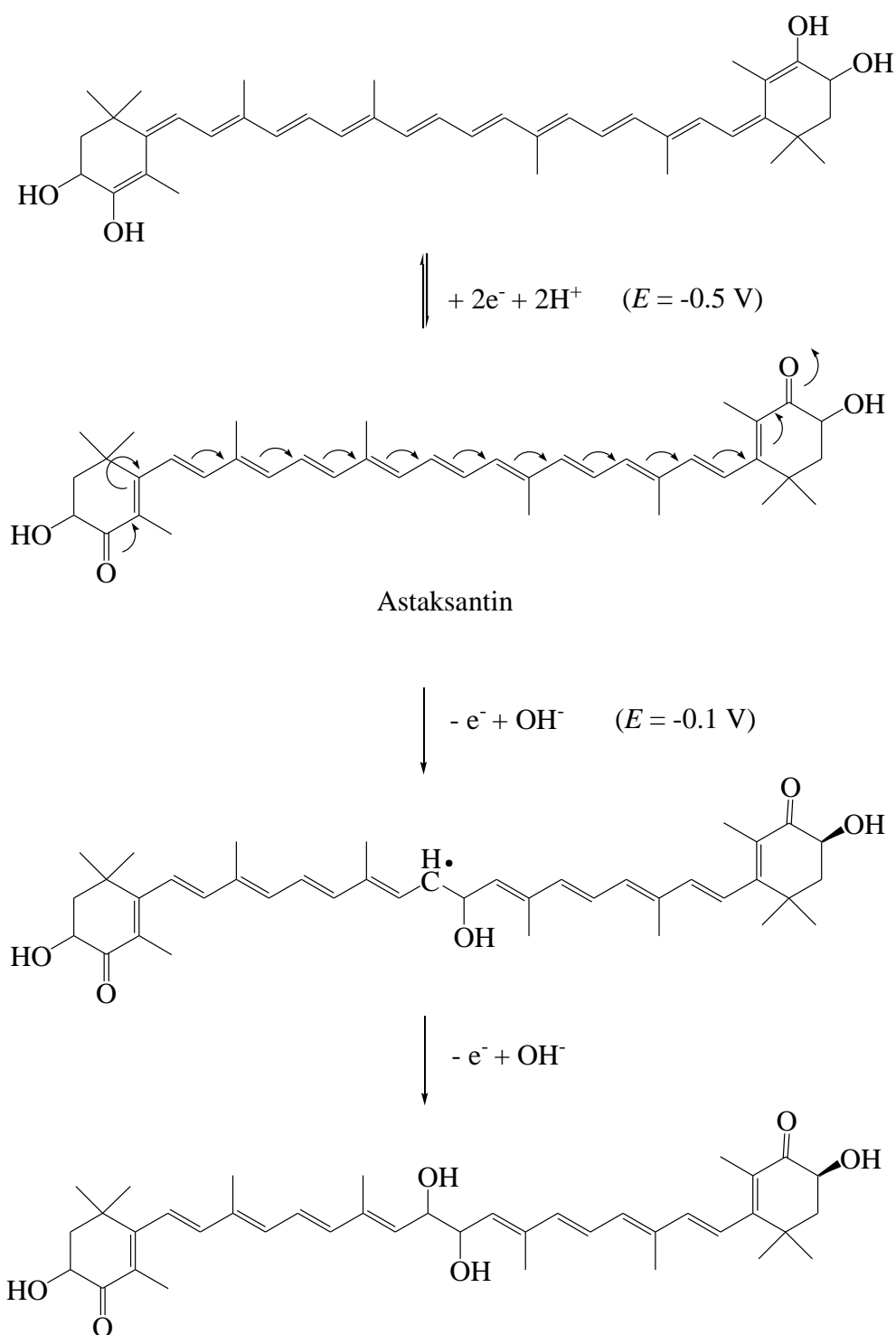


Slika 4.32. Pravokutnovalni voltamogram precipitiranog mikrofilma otopine astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ imobiliziranog na PIGE i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, 5, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Na slici 4.32. prikazan je pravokutnovalni voltamogram precipitiranog filma astaksantina imobiliziranog na površini PIGE koja je uronjena u vodenu otopinu $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Pri frekvenciji od 100 Hz , dobiveni voltamogram se sastoji od vala 1 pri vršnom potencijalu od $-0,345 \text{ V}$ *versus* $\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$. Odgovarajući vršni potencijali početne i povratne komponente struje su pri $-0,363 \text{ V}$ te $-0,331 \text{ V}$. Dobro definirana povratna, redukcijska komponenta upućuje da je prvi prijenos elektrona reverzibilan.

Slabo izražen val 2 pri potencijalu od -0,10 V praćen je drugim reverzibilnim odzivom pri potencijalu od 0,335 V (val 3) i s još dva manja ireverzibilna odziva pri potencijalima od 0,470 V (val 4) i 0,650 V (val 5). Val 1 pripisuje se reverzibilnoj elektrodnoj reakciji keto skupina konjugiranih s ostalim dvostrukim vezama u molekuli astaksantina.²⁵⁰ Val 2 može se pripisati oksidaciji hidroksilnih skupina na površini elektrode jer je vidljiv i na čistoj elektrodi (vidi odziv prazne elektrode na slici 4.3.), ali i oksidaciji hidroksilnih skupina na krajevima poliizoprenoidnog lanca astaksantina. Reverzibilni odziv 3 rezultat je korištenja perklorne kiseline kao elektrolita u kombinaciji s PIGE što je potvrđeno provedbom mjerenja struje na praznoj PIGE u ovom vodenom elektrolitu (slika 4.32.). Činjenicu da odziv 3 raste u prisustvu astaksantina možemo povezati sa već uočenom pojavom da stabilnost radikal kationa zavisi o interakciji sa površinom elektrode. Totalno ireverzibilni vrhovi 4 i 5 rezultat su oksidacije poliizoprenoidnog lanca astaksantina. U toj reakciji prvim prijenosom elektrona nastaje alil radikal, a drugim prijenosom diol. Ovo je u skladu s rezultatima oksidacije astaksantina u organskom otapalu.²⁰⁴ U vodenom elektrolitu, valovi 4 i 5 nisu reverzibilni jer produkti oksidacije reagiraju s vodom. Slične rezultate, odnosno ireverzibilne procese oksidacije astaksantina u smjesi otapala s vodom, dobili su Oliveira i sur.²¹² Predloženi reakcijski mehanizam astaksantina prikazan je na slici 4.33.

U tablici 4.3. prikazane su vrijednosti vršnih potencijala strujnih valova dobivenih za mikrofilm astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pri različitim frekvencijama. Može se vidjeti da za val 1 i val 2 nema promjene vršnih potencijala s promjenom frekvencije što potvrđuje pretpostavku da su ovi elektrokemijski procesi reverzibilni. Kod vala 4 i vala 5 dolazi do pomaka vršnih potencijala prema pozitivnijim vrijednostima s porastom frekvencije. Oba pomaka zavise linearno o logaritmu frekvencije sa koeficijentima korelacije $r = 0,986$, za val 4, i $r = 0,980$ za val 5. Pri nižim frekvencijama ($f < 100 \text{ Hz}$) dolazi do pojave i vala 6 na potencijalu 0,836 V koji linearno raste za 80 mV s porastom frekvencije od 10 Hz do 75 Hz. Ovaj odziv može se pripisati oksidaciji hidroksilnih skupina na terminalnim grupama poliizoprenoidnog lanca astaksantina.²⁵¹



Slika 4.33. Predloženi reakcijski mehanizam elektrokemijske oksidacije astaksantina.

Tablica 4.3. Vrijednosti vršnih potencijala strujnih valova 1, 2, 4, 5 i 6 mikrofilma astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pri različitim frekvencijama. Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.32.

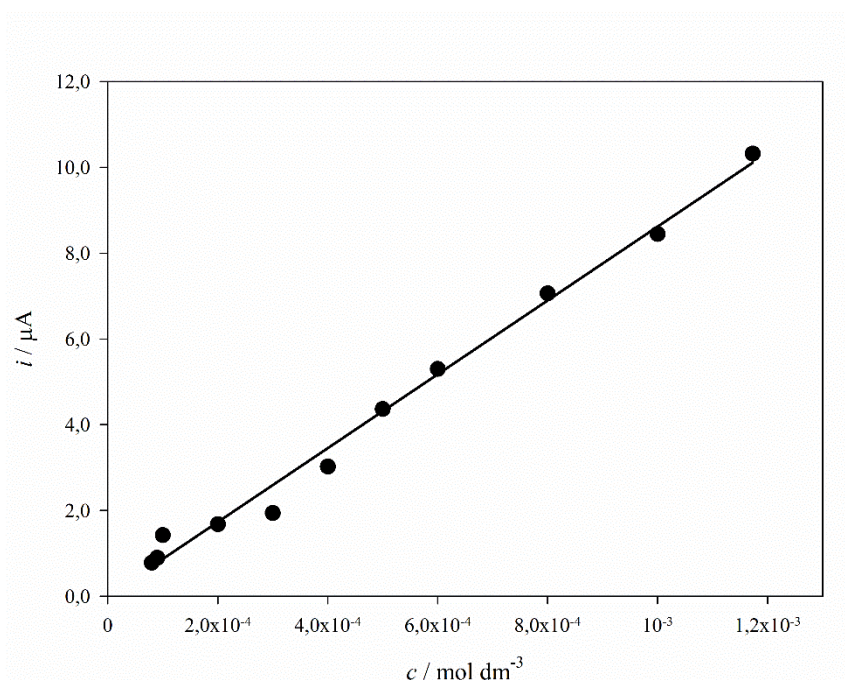
f / Hz	$E_{p,1} / \text{V}$	$E_{p,2} / \text{V}$	$E_{p,4} / \text{V}$	$E_{p,5} / \text{V}$	$E_{p,6} / \text{V}$
10	-0,339	-0,108	0,444	0,628	0,836
25	-0,337	-0,108	0,460	0,640	0,850
50	-0,347	-0,101	0,454	0,651	0,896
75	-0,345	-0,103	0,463	0,649	0,916
100	-0,345	-0,100	0,472	0,656	-
250	-0,347	-0,100	0,480	0,671	-
500	-0,342	-0,102	0,503	0,684	-
1000	-0,344	-0,102	0,505	0,705	-

Kako bi se utvrdila osjetljivost ispitivane metode za određivanje astaksantina u obliku imobiliziranog precipitiranog filma, elektrodna reakcija ovog spoja praćena je preko promjene jakosti struje s promjenom koncentracije astaksantina za val 1 pri vršnom potencijalu od -0,345 V. Vršna struja vala 1 odabrana je kao referentna za određivanje analitičkih parametara ove metode zbog ranije navedenih karakteristika ovog vala. Ovisnost vršnih struja vala 1 o koncentraciji precipitiranog mikrofilma astaksantina na PIGE nastalog nanošenjem $5 \mu\text{L}$ otopine astaksantina u acetonu različitih koncentracija prikazana je na slici 4.34. Ispitivane su koncentracije u rasponu od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ te se može vidjeti da SWV struja vala 1 linearno raste s povećanjem koncentracije precipitiranog mikrofilma astaksantina u rasponu od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,17 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije $r = 0,995$. Za astaksantin je, ovom metodom, u usporedbi s metodama za β -karoten i lutein, dobivena linearnost u najširem području koncentracija. Iako na slici 4.34. nije prikazano, vršna struja naglo raste pri koncentracijama većim od $1,17 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, a zatim naglo pada kod maksimalne testirane koncentracije od $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Može se zaključiti da iznad koncentracije od $1,17 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ više nema dobro definiranog monosloja na površini elektrode te to utječe na vršnu struju odziva.

Postotak iskorištenja, koji govori o točnosti metode, za precipitirani mikrofilm astaksantina, uzimajući u obzir val 1, iznosi 105,18 % sa relativno većom standardnom devijacijom od 22,52 %.

Relativna standardna devijacija vršnog potencijala za val 1 jednaka je 0,82 % što ukazuje na visoku ponovljivost u njenoj identifikaciji i nekontaminiranost površine radne elektrode.

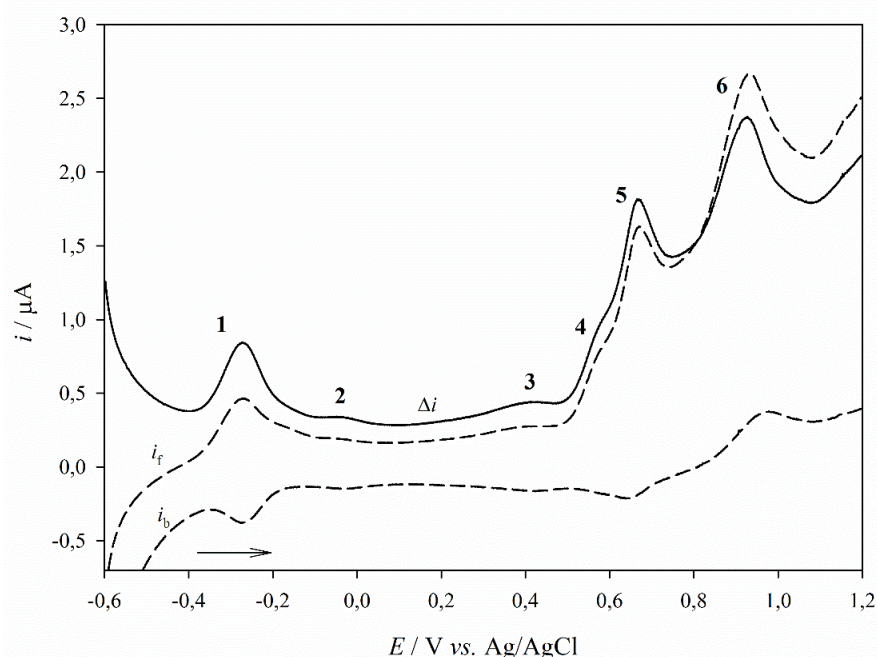
Na kraju su određene i granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za val 1. Granica detekcije za val 1 jednaka je $2,18 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je granice kvantifikacije $6,60 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 4.34. Ovisnost vršnih struja vala 1 precipitiranog mikrofilma astaksantina na PIGE o koncentraciji. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.32.

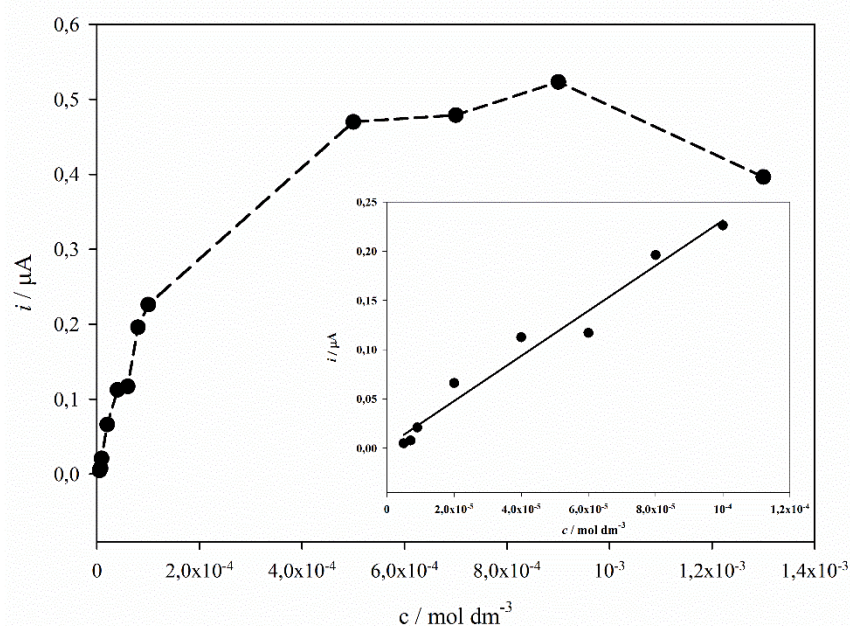
Osim mjerenja na PIGE, voltametrijska analiza astaksantina provedena je i na ručno izrađenoj elektrodi od ugljikove paste (mCPE) na kojoj je provedena i analiza β -karotena. Detaljan opis izrade mCPE objašnjen je u poglavlju 3.2.1.2. (str. 42). Uvjeti analize na ovoj elektrodi jednaki su uvjetima na PIGE, međutim s obzirom da je smanjena aktivna površina elektrode zbog smanjenja radijusa sa 5,0 mm na 0,1 mm, volumen otopine koja se nanosila na površinu elektrode i u ovom je slučaju smanjen sa 5,0 μL na 1,0 μL .

Elektrokemijski odziv dobiven nanošenjem 1 μL otopine astaksantina, koncentracije $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ na površinu mCPE te isparavanjem otapala do nastanka mikrofilma astaksantina prikazan je na slici 4.35. Može se uočiti sličnost s pravokutnovalnim voltamogramom precipitata astaksantina na PIGE (slika 4.32.). Međutim, uočeno je da su na SWV voltamogramu snimljenom na mCPE, valovi 5 i 6 jače izraženi nego na PIGE, a vršne struje su niže zbog manje radne površine elektrode i manjeg volumena analita. Vršni potencijal vala 1 pomaknut je za oko 70 mV u pozitivnom smjeru, a samim time su za oko 50 mV pomaknuti i ostali vršni potencijali valova 2, 4, 5 i 6 prema pozitivnijim vrijednostima. Tome je, najvjerojatnije, uzrok unutrašnji otpor radne elektrode koji se ne može kompenzirati troelektrodnim sustavom.²⁵² Val 1 javlja se na vršnom potencijalu od -0,271 V te ga prati val 2 na vršnom potencijalu -0,037 V. Kod oba odziva moguće je primijetiti redukcijski odziv na povratnoj komponenti struje, što upućuje na to da su ovi redoks procesi reverzibilni kao i na PIGE. Voltametrijski odzivi valova 4, 5 i 6 javljaju se pri vršnim potencijalima od 0,568 V, 0,666 V te 0,927 V. Na slici 4.35. može se vidjeti da je val 4 slabo izražen te da se gotovo spaja s valom 5. Usporedba odziva za mikrofilm astaksantina na PIGE i mCPE objašnjena je kasnije.



Slika 4.35. Pravokutnovalni voltamogram precipitiranog mikrofilma otopine astaksantina, koncentracije $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ imobiliziranog na mCPE i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, 5, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Kako bi se dobila informacija o analitičkim parametrima za ovu metodu, konstruirane su kalibracijske krivulje za astaksantin u obliku imobiliziranog mikrofilma. Na slici 4.36. prikazana je ovisnost promjene vršne struje s promjenom koncentracije. Mjerenja su provedena u rasponu od $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ te se može primijetiti da su na mCPE uspješno detektirane nešto niže koncentracije, nego što je to bio slučaj na PIGE što upućuje da je ova elektroda osjetljivija. Linearna ovisnost dobivena je u rasponu koncentracija precipitiranog mikrofilma astaksantina na mCPE za val 1 od $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije $r = 0,984$ koji upućuje na visoku korelaciju za linearnu ovisnost odziva strujnog vala o koncentraciji analiziranog astaksantina. Iako su na mCPE detektirane niže ispitivane koncentracije astaksantina, iznad koncentracije od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, strujni odziv vala 1 ne mijenja se linearno s koncentracijom analita, odnosno dolazi do zasićenja površine elektrode te su vršne struje manje nego što bi teoretski trebale biti.



Slika 4.36. Ovisnost vršnih struja vala 1 imobiliziranog mikrofilma astaksantina na mCPE o koncentraciji. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.35.

Daljnjom analizom dobivenih rezultata na mCPE određen je postotak iskorištenja, odnosno točnost metode, koji je iznosio 106,75 %, sa standardnom devijacijom od 20,62 %. Usporedbom standardne devijacije rezultata dobivenih na PIGE za imobilizirani mikrofilm astaksantina,

može se vidjeti kako je voltametrija imobiliziranog mikrofilma na mCPE nešto reproducibilnija tehnika, međutim i ovdje je standardna devijacija dosta visoka.

Relativna standardna devijacija vršnih potencijala za val 1 jednaka je 1,16 %, što ukazuje na visoku ponovljivost u identifikaciji oksidacijskog vala. Ova vrijednost je nešto veća od vrijednosti dobivene na PIGE, što se može objasniti iznimno malom radnom površinom.

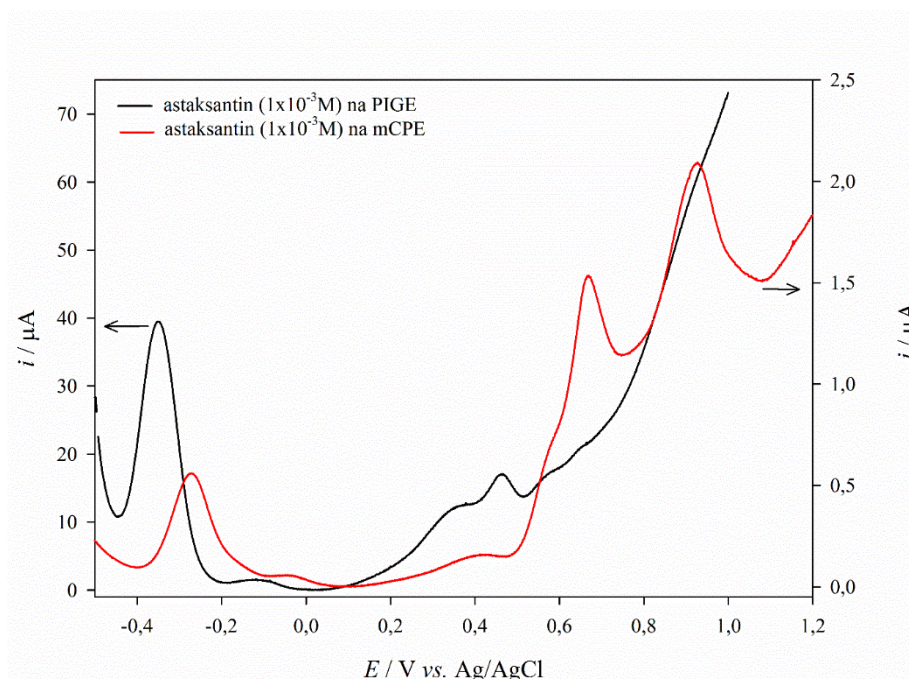
Na kraju, određene su granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za val 1 koje su se pokazale nižima od onih izračunatih za PIGE elektrodu. Granica detekcije za val 1 iznosi $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je granica kvantifikacije $1,07 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tablica 4.4. Vrijednosti vršnih struja strujnih valova 1, 2, 4, 5 i 6 mikrofilma astaksantina mjenog na mCPE za različite ispitivane koncentracije. Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.35.

$c / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$i_{p,1} / \text{V}$	$i_{p,2} / \text{V}$	$i_{p,4} / \text{V}$	$i_{p,5} / \text{V}$	$i_{p,6} / \text{V}$
$5,0 \cdot 10^{-6}$	0,005	0,004	0,0003	-	-
$7,0 \cdot 10^{-6}$	0,008	0,007	0,0080	-	-
$9,0 \cdot 10^{-6}$	0,021	0,019	0,0127	-	-
$2,0 \cdot 10^{-5}$	0,066	0,010	0,0026	-	-
$4,0 \cdot 10^{-5}$	0,113	0,009	0,0209	0,003	0,007
$6,0 \cdot 10^{-5}$	0,117	0,016	0,0278	0,054	0,020
$8,0 \cdot 10^{-5}$	0,196	0,018	0,0563	0,039	0,069
$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,226	0,022	0,0298	0,022	0,028
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,470	0,057	-	0,869	0,141
$7,0 \cdot 10^{-4}$	0,479	0,024	-	0,365	0,441
$9,0 \cdot 10^{-4}$	0,523	0,022	-	0,902	0,600
$1,3 \cdot 10^{-3}$	0,396	0,015	-	0,403	0,763

U tablici 4.4. prikazane su vrijednosti vršnih struja valova 1, 2, 4, 5 i 6 mikrofilma astaksantina mjenog na mCPE za različite ispitivane koncentracije. Vidi se da je analitička primjenjivost četvrtog, petog i šestog vala manja od one prvog vala. Vršne struje vala 4 ne mogu se očitati pri

koncentracijama većim od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, a vršne struje valova 5 i 6 se ne mogu očitati kad je koncentracija manja od $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, no linearno se povećavaju iznad navedene koncentracije. Uzevši u obzir pomak potencijala izazvan unutarnjim otporom radne elektrode, odzivi na slici 4.35. mogu se opisati reakcijskom shemom 4.33. i oksidacijom terminalnih hidroksilnih skupina.



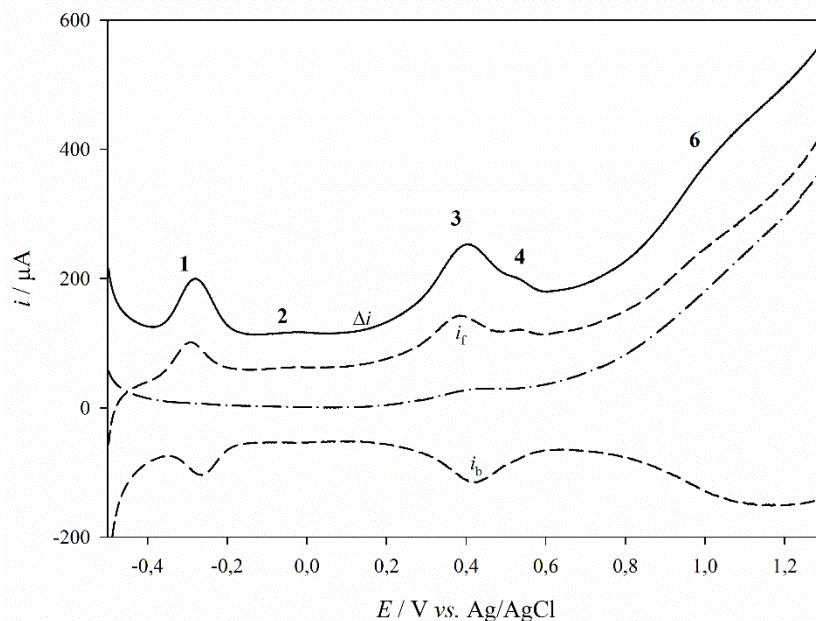
Slika 4.37. Pravokutnovalni voltamogrami oksidacije astaksantina, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, imobiliziranog na PIGE (crna linija) i na mCPE (crvena linija) i uronjenog u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Prikazani su ukupni SWV odzivi (Δi). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.35.

Na slici 4.37. prikazani su pravokutnovalni voltamogrami oksidacije astaksantina, koncentracije $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ na elektrodama PIGE i mCPE pri istim eksperimentalnim uvjetima. Usporedbom odziva na dvjema elektrodama može se vidjeti da je odziv na mCPE pomaknut prema pozitivnijim vrijednostima potencijala zbog spomenutog otpora. Također, val 4 je na mCPE slabije izražen. Međutim, računanjem gustoća vršnih struja valova 5 i 6 na PIGE i mCPE, dobivene su više vrijednosti na mCPE. Gustoće vršnih struja na PIGE su $0,0377 \mu\text{A cm}^{-2}$ za val 5 te $7,038 \mu\text{A cm}^{-2}$ za val 6, dok su na mCPE ove vrijednosti jednake $0,151 \mu\text{A cm}^{-2}$ za val 5 i $8,854 \mu\text{A cm}^{-2}$ za val 6.

4.2.3.3. Voltametrijna imobilizirane kapi astaksantina

Voltametrijna imobilizirane kapi je, kao što je ranije rečeno, provedena na svim uzorcima standarda, dakle na β -karotenu, luteinu i astaksantinu. Iako je topljivost β -karotena i luteina u DMSO-u velika (30 mg dm^{-3} za β -karoten i 1000 mg dm^{-3} za lutein), oni nisu pokazali elektrokemijski odziv primjenom pravokutnovalne voltametrije na tehniku imobilizirane kapi. Astaksantin je, od spomenuta tri spoja, najtopljiviji u DMSO-u, oko 50 g dm^{-3} te je primjenom pravokutnovalne voltametrije na imobiliziranu kap astaksantina na površini PIGE dobiven elektrooksidacijski odziv. S obzirom da je korišten novi sustav, odnosno tehnika, mjerenja su, osim u već ranije spomenutom elektrolitu, perklornoj kiselini ($0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$), provedena i u drugom elektrolitu, često korištenom kalijevom nitratu ($0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$).

Na slici 4.38. prikazan je pravokutnovalni voltamogram astaksantina u obliku imobilizirane kapi na površini PIGE koja je uronjena u vodenu otopinu $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Pri frekvenciji od 100 Hz , voltamogram se sastoji od vala 1 pri vršnom potencijalu od $-0,276 \text{ V}$ versus $\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$. Dobro definirana povratna, redukcijska komponenta upućuje da je prvi prijenos elektrona reverzibilan što je u skladu i s rezultatima dobivenima voltametrijom mikrofilma astaksantina na PIGE i mCPE (slike 4.32. i 4.35.). Reverzibilnost prvog prijenosa elektrona potvrđena je i promatranjem vršnog potencijala $E_{p,1}$ u tablici 4.5. koji ne ovisi o pravokutnovalnoj frekvenciji ($10 \text{ Hz} < f < 1000 \text{ Hz}$). Slabo izražen drugi val pri potencijalu od $-0,032 \text{ V}$ praćen je reverzibilnim odzivom pri potencijalu od $0,335 \text{ V}$. Val 3 se javlja i na praznoj PIGE, ali raste u prisustvu astaksantina. Za razliku od odziva mikrofilma na PIGE i mCPE, u slučaju mikrokapi može se zamijetiti samo val 4 pri potencijalu od $0,529 \text{ V}$, kad je $f = 100 \text{ Hz}$, dok val 5 nije prisutan. Nadalje, vidljiv je i široki, slabo definirani val 6 pri potencijalu od $1,026 \text{ V}$. U tablici 4.5. navedene su vrijednosti vršnih potencijala strujnih valova 1, 2, 4 i 6 mikrokapi astaksantina kod različitih frekvencija pobude. Vidi se da za valove 4 i 6 dolazi do promjene vršnih potencijala s promjenom frekvencije što potvrđuje da su ovi elektrokemijski procesi ireverzibilni. Može se, također, vidjeti da se val 6 gubi pri frekvencijama manjim od 75 Hz jer ga prekriva osnovna struja. Zbog toga se može pretpostaviti da je i val 5 maskiran osnovnom strujom.



Slika 4.38. Pravokutnovalni voltamogram mikrokapi astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Za sve navedene odzive, u usporedbi s rezultatima voltametrije precipitiranog filma astaksantina na PIGE, došlo je do pomaka vršnih potencijala u pozitivnom smjeru za oko 50 mV. Ovi rezultati su, međutim, u skladu s rezultatima dobivenima za precipitirani mikrofilm astaksantina na mCPE. Bitna razlika između elektrodnih reakcija precipitata i molekula otopljenih u DMSO jest prijenos aniona osnovnog elektrolita iz vode u kapljicu DMSO koji je potreban da se održi elektroneutralnost. U kapljici se astaksantin može oksidirati do radikal kationa i dikationa jer u DMSO ima malo vode, ali se nastali pozitivni naboji moraju neutralizirati prijenosom aniona ClO_4^- iz vode u DMSO. Za taj prijenos potrebna je energija koja se manifestira kao porast vršnih potencijala. Moguć je i prijenos aniona OH^- i njegova reakcija s kationima astaksantina, slično reakcijskoj shemi 4.33. Konačno, za redukciju kinona kod -0,5 V potreban je prijenos kationa H_3O^+ iz vode u DMSO, a za oksidaciju hidrokinona potrebno je da se protoni vrate u vodu. Svi ti procesi utječu na vršne potencijale odziva.

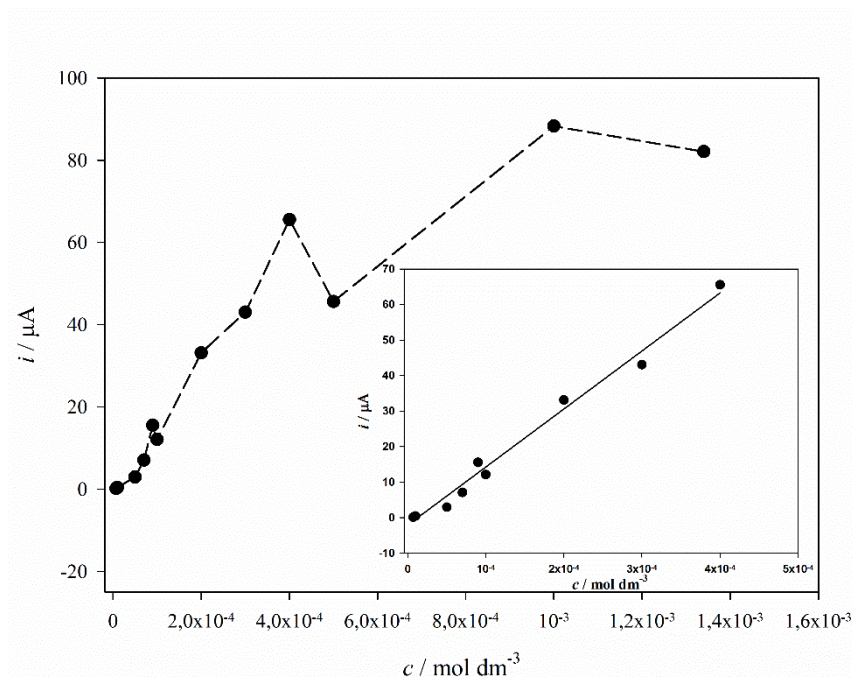
Tablica 4.5. Vrijednosti vršnih potencijala strujnih valova 1, 2, 4 i 6 mikrokapi astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pri različitim frekvencijama. Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.38.

f / Hz	$E_{p,1} / \text{V}$	$E_{p,2} / \text{V}$	$E_{p,4} / \text{V}$	$E_{p,6} / \text{V}$
10	-0,278	-0,054	0,502	-
25	-0,278	-0,048	0,520	-
50	-0,278	-0,048	0,520	-
75	-0,274	-0,032	0,533	0,915
100	-0,280	-0,032	0,529	1,026
250	-0,278	-0,044	0,555	1,060
500	-0,278	-0,026	0,579	1,083
1000	-0,276	-0,050	0,587	1,094

Odnos između vršnih struja vala 1 i koncentracije astaksantina u mikrokapi nanesejoj na PIGE prikazan je na slici 4.39., a umetak na istoj slici prikazuje linearnu ovisnost u užem području koncentracija u svrhu dobivanja analitičkih parametara. Mjerenje je provedeno u rasponu koncentracija astaksantina od $7,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Primijenjena metoda pokazala je linearan odziv u rasponu koncentracija od $7,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s koeficijentom korelacije $r = 0,992$.

Točnost metode izražena je preko postotka iskorištenja vala 1 koji iznosi 121,70 %. Relativna standardna devijacija vršnih struja za val 1 maksimalne ispitivane koncentracije astaksantina u obliku imobilizirane kapi iznosi 3,69 %, dok je relativna standardna devijacija vršnih potencijala za val 1 jednaka 0,413 %, što ukazuje na nekontaminiranost površine radne elektrode i visoku ponovljivost u identifikaciji oksidacijskog vala.

Određene su i granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za astaksantin u obliku imobilizirane mikrokapi. Granica detekcije za val 1 jednaka je $6,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dok je granica kvantifikacije $2,11 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. S obzirom na mjereno područje i relativno nisku koncentraciju karotenoida koja se očekuje u realnim uzorcima, astaksantin se u obliku mikrokapi pokazao kao dobar standard za određivanje ukupnih karotenoida u uzorcima morskih organizama.



Slika 4.39. Ovisnost vršnih struja vala 1 imobilizirane mikrokapi astaksantina na PIGE o koncentraciji. Umetak na slici: ovisnost vršnih struja vala 1 imobilizirane mikrokapi astaksantina na PIGE o koncentraciji u linearnom području. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.38.

Nakon analize u kiselj okolini, odnosno korištenja perklorne kiseline kao osnovnog elektrolita, ispitala se mogućnost promjene elektrolita radi objašnjavanja mehanizma oksidacije astaksantina u vodenom mediju. Ispitan je najčešće korišten elektrolit, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ pri optimalnim eksperimentalnim uvjetima: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$ s promjenom pH-vrijednosti. Pravokutnovalni odzivi za otopinu astaksantina u DMSO-u, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, snimljeni su na PIGE pri pH-vrijednostima osnovnog elektrolita između 1,0 i 9,0. Voltamogrami dobiveni kod tri različite pH-vrijednosti prikazani su na slici 4.40. Oblik SWV odziva mikrokapi astaksantina mijenja se s promjenom pH-vrijednosti osnovnog elektrolita. Između pH 1,0 i 5,0 za mikrokapi astaksantina (slika 4.40. A) dobiveni su gotovo identični odzivi kao i za mikrofilm astaksantina ispitivan na PIGE i mCPE (slike 4.32. i 4.35.). Vršni potencijali prva tri odziva pomiču se u negativnom smjeru s povećanjem pH-vrijednosti, a za preostala tri vala ne dolazi do pomaka vršnih potencijala s porastom pH-vrijednosti. Također, pri pH 5,0 ne može se identificirati val 2 na voltamogramu (slika 4.40. B), dok se val 6 javlja isključivo u najkiselijem elektrolitu (pH 1,0). Daljnjim porastom pH-vrijednosti do pH

6,0 i pH 7,0, odzivi su identični osim što i dalje dolazi do pomaka vršnih potencijala prema negativnijim vrijednostima.

Pri pH 8,0 i 9,0, val 1 je izrazito slabo razvijen te se javlja pri najnegativnijem vršnom potencijalu ($E_{p,1} = -0,763$ V), dok val 2 dolazi do izražaja, odnosno veća mu je vršna struja (slika 4.40. C). Vršni potencijali strujnih valova 1 i 2 linearno ovise o pH-vrijednosti medija, što je prikazano na slici 4.41. U oba slučaja uočeno je da se povećanjem pH-vrijednosti otopine vršni potencijali pomiču u negativnom smjeru.

Linearna ovisnost vršnog potencijala strujnog vala 1 o pH uočena je između pH 1,0 i 9,0, odnosno u cijelom rasponu ispitivanih pH-vrijednosti i opisana je jednadžbom:

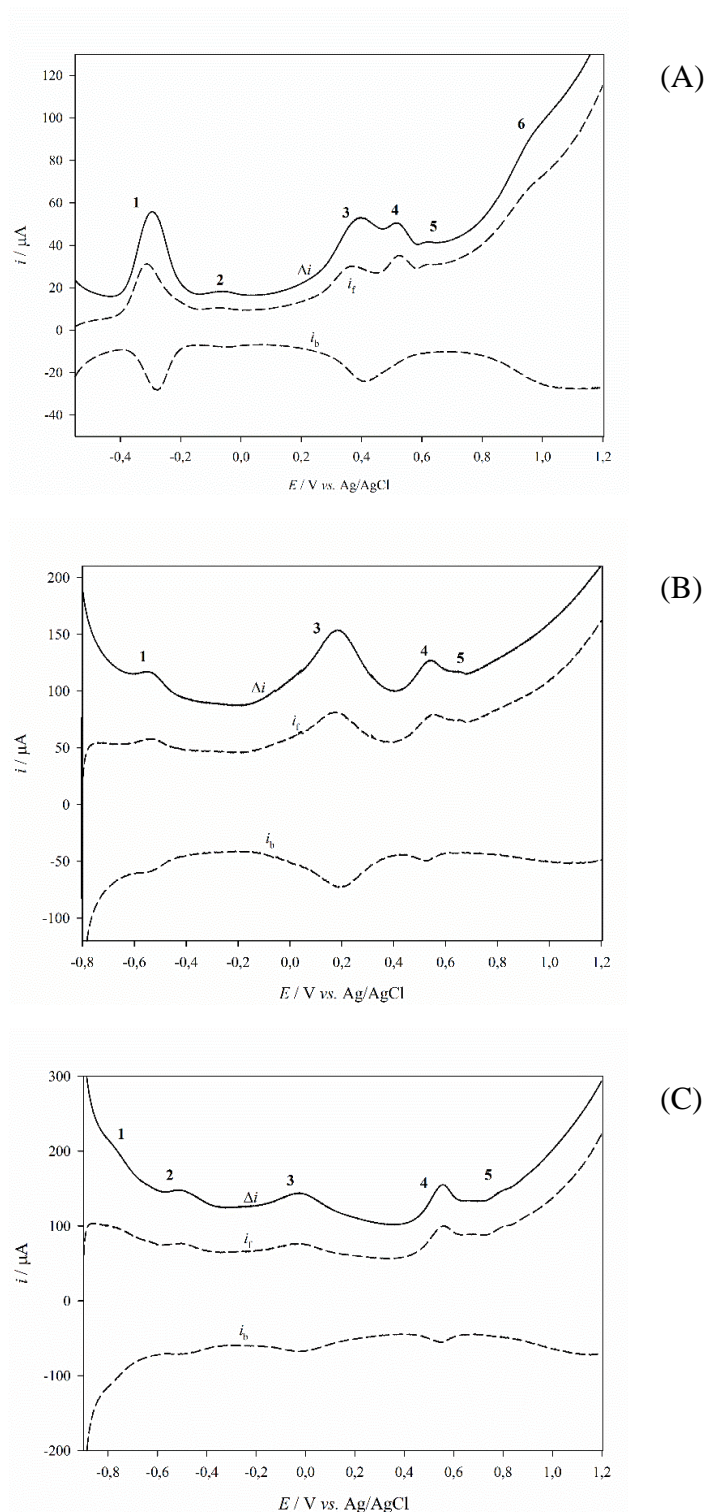
$$-E_{p,1}(\text{V}) = 0,243 + 0,058 \cdot \text{pH}, \quad r = 0,999.$$

S obzirom da nagib pravca ovisnosti $E_{p,1}$ vs. pH iznosi 58 mV/pH, može se zaključiti da u redoks reakciji karbonilne skupine na krajevima strukture astaksantina pri pH-vrijednostima između pH 1,0 i pH 9,0 sudjeluje jednak broj protona i elektrona (vidi reakcijsku shemu 4.33.).

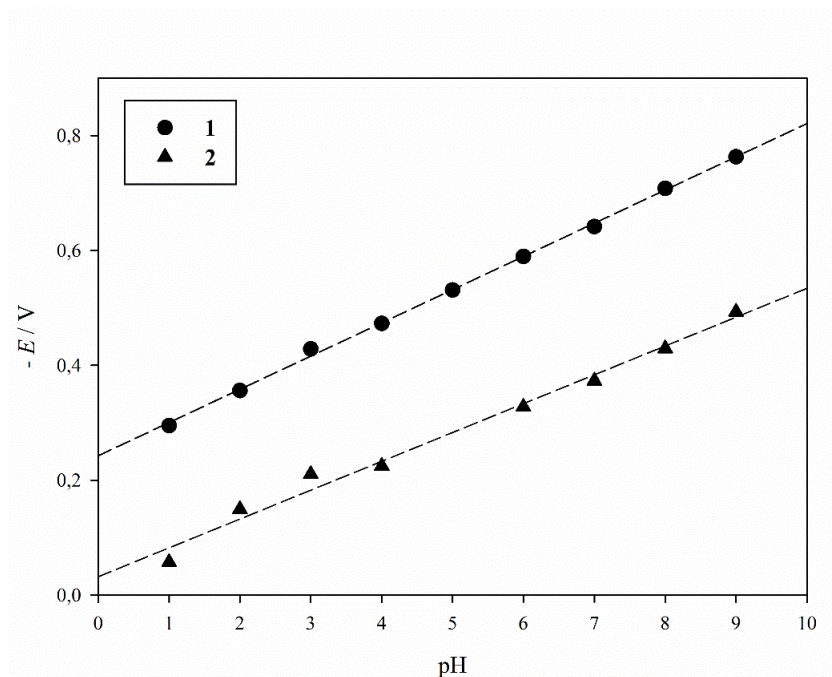
Vršni potencijal strujnog vala 2 također pokazuje linearnu ovisnost o pH između pH 1,0 i 9,0. Linearna ovisnost $E_{p,2}$ vs. pH opisana je izrazom:

$$-E_{p,2}(\text{V}) = 0,032 + 0,050 \cdot \text{pH}, \quad r = 0,993.$$

Nagib od 50 mV/pH upućuje na zaključak da i u ovoj redoks reakciji oksidacije hidroksilne skupine na površini elektrode sudjeluje jednak broj protona i elektrona: $=\dot{\text{C}}\text{-OH} \leftrightarrow =\text{C=O} + \text{e}^- + \text{H}^+$. Podsjećam da se u tablici 4.4. vidi da vršna struja vala 2 ne ovisi o koncentraciji astaksantina.

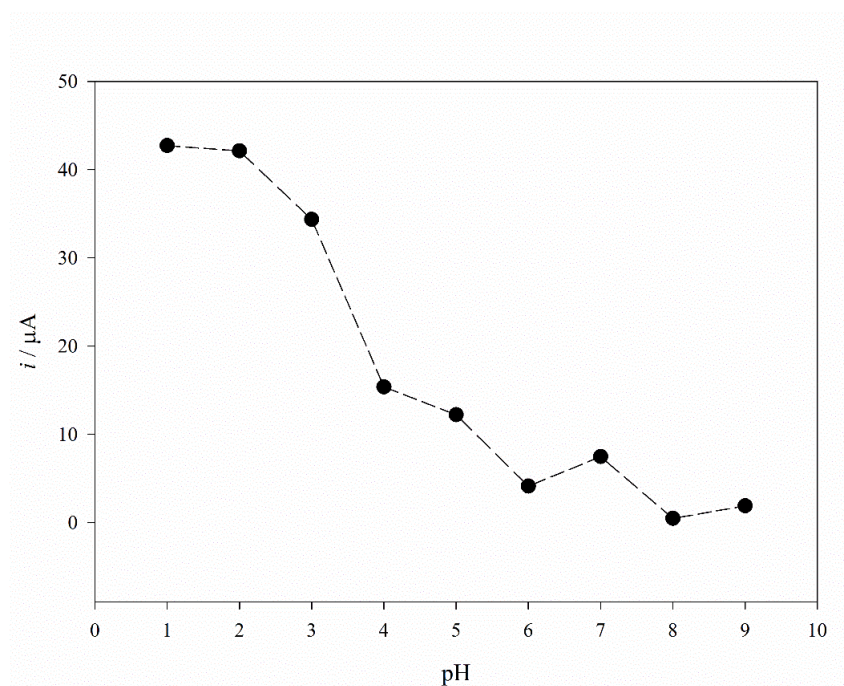


Slika 4.40. Pravokutnovalni voltamogrami mikrokapi astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3}$ mol dm $^{-3}$ imobilizirane na PIGE i uronjene u 0,1 mol dm $^{-3}$ KNO $_3$. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100$ Hz, $E_{\text{sw}} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV. pH-vrijednosti: 1,0 (A), 5,0 (B), 9,0 (C). Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, 5, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.



Slika 4.41. Ovisnost vršnih potencijala strujnih valova 1 (●) i 2 (▲) mikrokapi astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, o pH-vrijednosti osnovnog elektrolita ($0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$). Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.40.

Dijagram ovisnosti vršne struje vala 1 mikrokapi astaksantina o pH prikazan je na slici 4.42. Prva redoks reakcija astaksantina (strujni val 1) daje maksimalni strujni odziv u kiseljoj otopini, pH 1,0 do 3,0, a daljnjim povećanjem pH-vrijednosti strujni odziv vala 1 se naglo smanjuje, odnosno pri promjeni pH od 3,0 do 4,0, strujni odziv se smanjio čak 2,3 puta. Ovi rezultati idu u prilog prethodno korištenom elektrolitu, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ u kojem su dobiveni najbolji voltametrijski odzivi.



Slika 4.42. Ovisnost vršne struje vala 1 mikrokapi astaksantina, koncentracije $1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, o pH-vrijednosti osnovnog elektrolita ($0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$). Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.40.

4.3. Ekstrakcija

4.3.1. Ekstrakcija kapsaicinoida

U ovom radu ekstrakcija kapsaicinoida iz uzoraka čili paprika provedena je primjenom ultrazvučnih valova kao dodatnog izvora energije prema metodi iz literature.²¹⁷ Ova metoda je često primjenjivana u rutinskoj analizi kapsaicina u čili paprikama jer je relativno jednostavna i omogućuje brzu i učinkovitu ekstrakciju kapsaicinoida. Za razliku od metode opisane u literaturi²¹⁷, umjesto metanola odabrano je drugo otapalo, etanol. Promjena otapala primijenjena je zbog niske temperature vrelišta^{219, 220} etanola, što je ujedno poželjno u primjeni tehnike imobiliziranog mikrofilma zbog brzog isparavanja organskog otapala.²⁵³ S obzirom da se daljnja analiza temelji na vodenoj otopini elektrolita, etanol je korišten kao otapalo. Odabrana je temperatura od 50°C zbog niske temperature vrelišta odabranog otapala te je njegov volumen smanjen zbog male količine uzorka.

Tablica 4.6. Vršni potencijali i vršne struje dobiveni za ekstrakte iz čili paprike Bhut Jolokie s dvije metode ekstrakcija primjenom SWV na imobilizirani mikrofilm na površini PIGE i uronjenih u 0,1 mol dm⁻³ KNO₃. Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV.

Čili paprika	Metoda 1 – 20 min		Metoda 2 - 120 min	
	$E_{p,1}$ / V	$i_{p,1}$ / μ A	$E_{p,1}$ / V	$i_{p,1}$ / μ A
Bhut Jolokia ^a	0,273	244,6	0,269	266,8

Prethodno ekstrakciji svih ispitivanih uzoraka čili paprika, na najljućoj testiranoj paprici, Bhut Jolokiji, ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije. U tablici 4.6. prikazane su vrijednosti za pravokutnovalne vršne potencijale i vršne struje za ekstrakte čili paprike Bhut Jolokie dobivene na ultrazvučnoj kupelji u vremenu od 20 minuta (a) te 120 minuta (b). Može se vidjeti da nije došlo do pomaka potencijala niti u anodnom niti u katodnom smjeru. Također, odnos vršnih struja za ova dva slučaja gotovo je 1:1. Uzorak koji je podvrgnut ekstrakciji 120 minuta na ultrazvučnoj kupelji (b) ima nešto viši prosječni odziv struje što se može objasniti dužim trajanjem same ekstrakcije. Međutim, vršna struja je svega 9 % veća od one dobivene

ekstrakcijom u trajanju od 20 minuta što je gotovo neznatno s obzirom na vrijeme trajanja ekstrakcije. Zbog toga su ostali uzorci čili paprika ekstrahirani primjenom metode s kraćim vremenskim trajanjem ekstrakcije od 20 minuta. Dobiveni rezultati ukazuju da je metoda ekstrakcije kaspainoida brza sa visokom učinkovitošću.

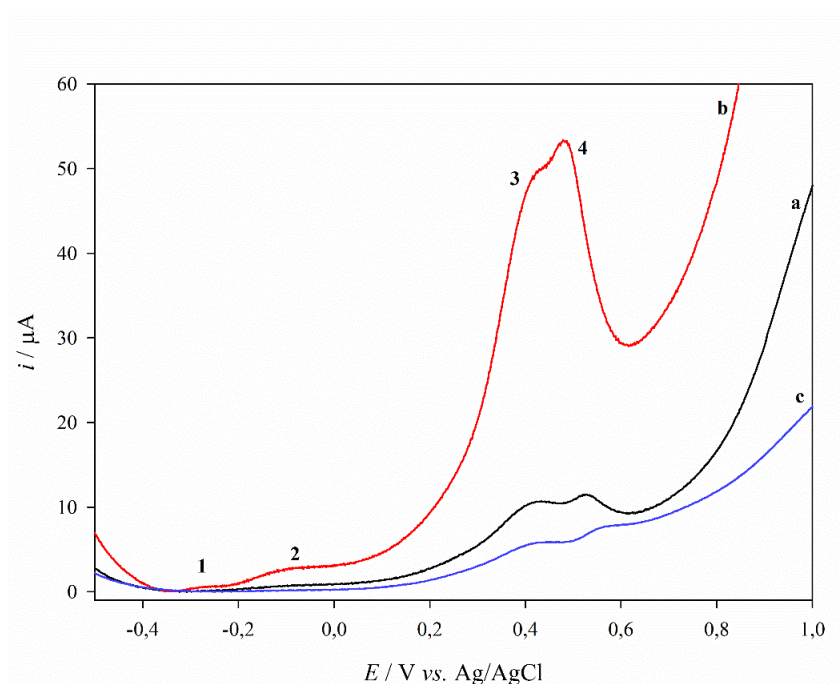
4.3.2. Ekstrakcija karotenoida

S obzirom da u literaturi postoje brojne metode ekstrakcije karotenoida iz realnih uzoraka biljnog i životinjskog porijekla^{219, 220, 247}, u ovom radu ispitane su tri najčešće korištene metode u analizi uzoraka životinjskog porijekla.

Karotenodi su vrlo termolabilni spojevi, osjetljivi na utjecaj svjetlosti i kisika^{252, 253}, stoga metoda ekstrakcije ovih spojeva mora biti što brža, jednostavna, lako primjenjiva te ponovljiva. Visoka temperatura može utjecati na razgradnju karotenoida u uzorku²⁵⁵, a preniska temperatura neće omogućiti ekstrakciju karotenoida iz uzoraka te su stoga uzorci stavljeni u vodenu kupelj na 50°C koja se pokazala optimalnom za njihovu ekstrakciju. Cilj je bio dobiti optimalnu metodu ekstrakcije koja bi omogućila karakterizaciju karotenoida u uzorcima morskih organizama pomoću elektrokemijskih tehnika.

Na slici 4.43. prikazana su tri usporedna voltamograma za uzorak ekstrakta iz škampa dobivenih pomoću metoda 1 (a), 2 (b) i 3 (c) koje su opisane u poglavlju 3.3.3.2. Korištena voltametrijska tehnika je bila pravokutnovalna voltimetrija primijenjena na imobilizirani mikrofilm (metoda 1(a) i 3(c)) te na imobiliziranu kap (metoda 2(b)) na površini parafinom impregnirane grafitne elektrode uronjene u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ otopinu. Dobivene vršne struje za uzorak (b) dobivene metodom 2 oko pet puta su veće u odnosu na uzorak dobiven ekstrakcijom prema metodi 1 (a), a čak šest puta veće u odnosu na uzorak dobiven ekstrakcijom po metodi 3 (c). U prilog ovoj metodi ide i pojava vala 1 pri potencijalu od -0,281 V s vršnom strujom od 0,154 μA koji nije zabilježen provedbom voltametrijskih mjerenja na druga dva uzorka. Ostali prisutni odzivi su: val 2 pri potencijalu od -0,118 V sa vršnom strujom od 0,787 μA te val 4 pri potencijalu od 0,491 V i vršnom strujom od 9,672 μA. Na sam odziv utječe i primijenjena tehnika analize pa se i ovdje može vidjeti da je tehnika imobilizirane kapi najosjetljivija tehnika od ispitivanih elektrokemijskih metoda. Uspoređujući odzive za ekstrakte dobivene metodama 1 (a) i 3 (c), može se primijetiti da je bolji odziv dobiven za metodu 1, odnosno mogu se očitati dva pravokutnovalna vala, val 2 s vršnom strujom od 0,220 μA pri

potencijalu od -0,086 V te val 4 čija vršna struja iznosi 1,498 μA na vršnom potencijalu od 0,529 V. Kod odziva dobivenog za metodu 3 može se primijetiti samo jedan val pri potencijalu od 0,566 V čija vršna struja iznosi 0,688 μA (val 4). Odziv koji je na slici 4.43. označen sa oznakom 3 je val koji je ranije objašnjen kod standarda karotenoida te je rezultat korištenja perklorne kiseline kao elektrolita u kombinaciji s PIGE što je potvrđeno provedbom mjerenja struje na praznoj PIGE u ovom vodenom elektrolitu prije svakog mjerenja.



Slika 4.43. Pravokutnovalni voltamogrami za ekstrakte iz uzorka škampa dobiveni različitim metodama ekstrakcije: metoda 1 (a), metoda 2 (b) i metoda 3 (c), imobiliziranih na PIGE i uronjenih u 0,1 mol dm^{-3} HClO_4 . Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100$ Hz, $E_{\text{sw}} = 50$ mV i $\Delta E = 2$ mV. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4 i ukupni SWV odzivi (Δi).

Uzorci riba lososa, brancina, trlje, kokota te račića kozice također su ekstrahirani na sva tri načina. Elektrokemijska analiza ekstrakata dobivenih metodom 3 za sve navedene uzorke nije dala vidljive odzive, odnosno, ekstrakcija nije bila učinkovita. Također, za ekstrakte brancina elektrokemijski nije zabilježen odziv niti u jednom od ekstrakata dobivenih drugim dvjema metodama. Uzrok može biti nedovoljna osjetljivost same metode, u slučaju da su koncentracije karotenoida u uzorku brancina ispod granice detekcije (LOD). Zbog toga je provedena i spektrofotometrijska analiza svih uzoraka, a dobiveni rezultati uspoređeni su s voltametrijskim

odzivima. Rezultati spektrofotometrijske analize objašnjeni su u daljnjem tekstu. Rezultati dobiveni primjenom SWV na ostale uzorke ekstrahirane drugim dvjema metodama prikazani su u tablici 4.7.

Tablica 4.7. Rezultati pravokutnovalne voltametrije za uzorke različitih ekstrakta morskih organizama dobivenih metodom 1 (M1) i metodom 2 (M2). Eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.43.

Vrsta uzorka		Losos		Trlja		Kokot		Kozica	
		M 1	M 2	M 1	M 2	M 1	M 2	M 1	M 2
VRH 1	$E_{p,1} / V$	-	-	-	-	-	-	-0,326	-0,273
	$i_{p,1} / \mu A$	-	-	-	-	-	-	2,121	2,020
VRH 2	$E_{p,2} / V$	-	-	-0,074	-0,110	-0,112	-0,110	-0,162	-0,106
	$i_{p,2} / \mu A$	-	-	0,213	0,540	1,109	0,077	0,666	0,354
VRH 4	$E_{p,4} / V$	0,441	-	0,531	0,493	-	-	-	0,505
	$i_{p,4} / \mu A$	0,361	-	0,226	0,590	-	-	-	11,910
VRH 5	$E_{p,5} / V$	0,965	-	-	-	-	1,031	0,941	0,993
	$i_{p,5} / \mu A$	6,620	-	-	-	-	1,359	14,480	0,717

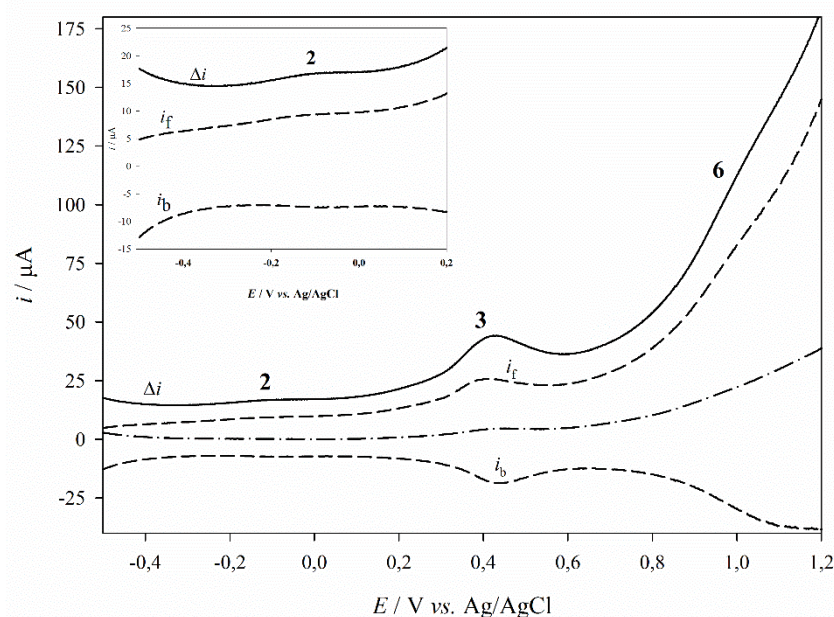
Za ekstrakte iz lososa dobivene metodom 1 vidljivi su pravokutnovalni vrhovi pri potencijalima od 0,441 V i 0,965 V, dok metodom 2 nije dobiven niti jedan odziv. Losos je izrazito masna vrsta ribe te je masnoća smetala u elektrokemijskom određivanju karotenoida u ovom uzorku. Iako prema literaturi^{254, 255} losos sadrži veliku količinu karotenoida, ove vrste ekstrakcija nisu se pokazale pogodnima za njihovu izolaciju. Kod uzoraka trlje, metoda 2 se pokazala 2,5 puta uspješnijom metodom u ekstrakciji karotenoida. Razlika u pomaku potencijala za ekstrakte trlje dobivene metodama 1 i 2 može se objasniti primjenom dviju različitih tehnika analize, odnosno tehnikama imobiliziranog mikrofilma i imobilizirane kapi. Za ribu kokot, dobiven je jedan oksidacijski val pri potencijalu od -0,112 V za ekstrakt dobiven metodom 1, dok su dva oksidacijska vala prisutna pri potencijalima od -0,110 V i 1,031 V za ekstrakt dobiven metodom 2. Razlika u rezultatima može se pripisati različitim tehnikama analize, odnosno elektrokemijskim reakcijama ovisno o sustavu na elektrodi. Za uzorak kozice, ekstrakti obje metode su pokazali elektrokemijske odzive bez obzira na metodu ekstrakcije, međutim

metodom 1 nije dobiven odziv pri potencijalu oko 0,500 V, dok su metodom 2 dobiveni isti odzivi kao i za ekstrakt škampa. Daljnja analiza elektrokemijskih mjerenja za uzorke morskih organizama nastavljena je u idućem poglavlju.

Prikazani rezultati i odzivi omogućili su odabir metode 2 kao optimalne metode za relativno brzu i jednostavnu ekstrakciju karotenoida iz uzoraka morskih organizama te su daljnja mjerenja provedena na ekstraktima dobivenima metodom 2.

4.4. Analiza morskih organizama pomoću elektrokemijskih tehnika

Nakon karakterizacije triju standarda karotenoida, β -karotena, astaksantina i luteina, pristupilo se analizi morskih organizama koji su uključivali ribe kokot, losos, brancin, trlju, običnu i kalifornijsku pastrvu te račiće, škamp i kozice. Prije elektrokemijskih mjerenja bilo je potrebno sve uzorke pripremiti, očistiti, homogenizirati, izvagati te ekstrahirati potencijalno prisutne karotenoide. Odabrana metoda ekstrakcije je bila metoda 2 prethodno opisana u poglavlju 4.3.2. pa su uzorci voltametrijski ispitani primjenom voltametrije imobilizirane kapi.

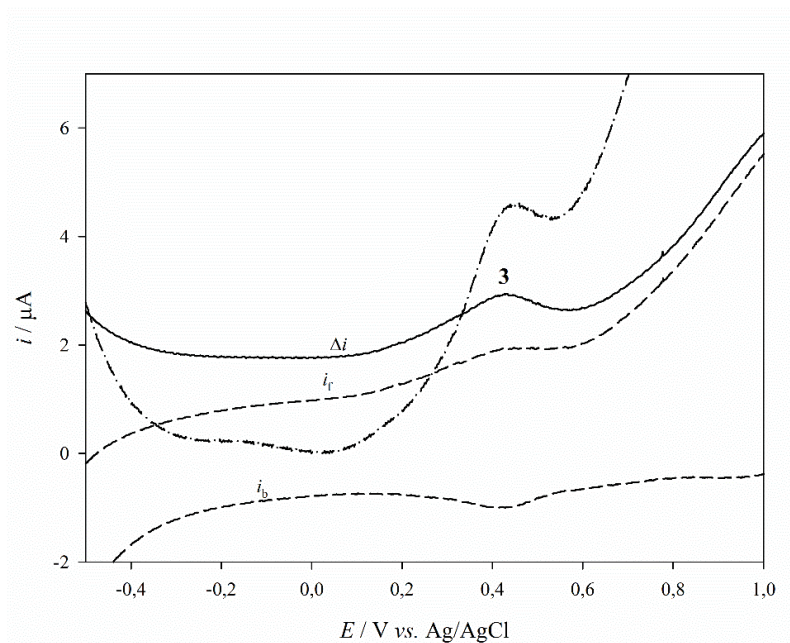


Slika 4.44. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe kokot imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti: $f = 100 \text{ Hz}$, $E_{\text{SW}} = 50 \text{ mV}$ i $\Delta E = 2 \text{ mV}$. Na slici su prikazani strujni valovi 2, 3, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje. Umetak na slici: uvećani prikaz vala 2 za ukupni SWV odziv (Δi) te početnu (i_f) i povratnu (i_b) komponentu struje.

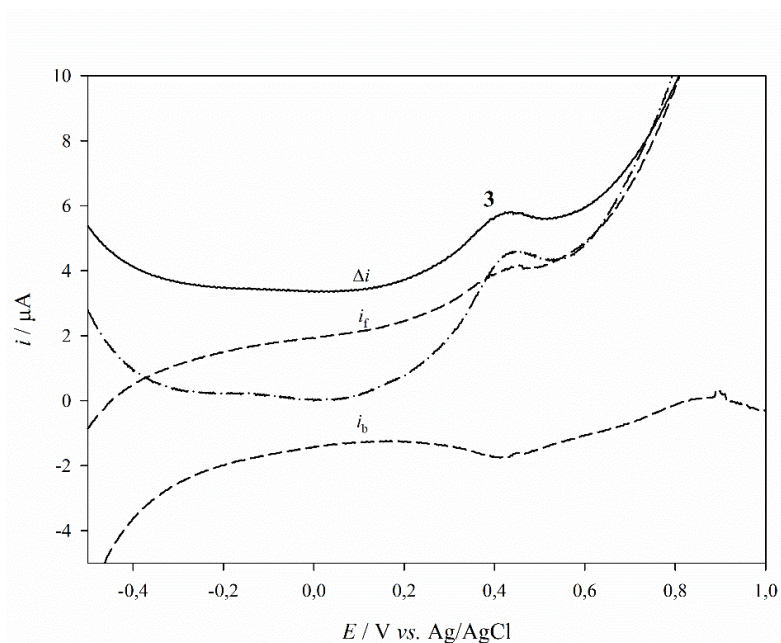
Na slici 4.44. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz ribe kokot (lat. *Trigla lyra*) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Mogu se raspoznati tri oksidacijska vrha. Reverzibilni široki val 2 označen je s ovim brojem jer se nalazi blizu potencijalu vala 2 za kap astaksantina (slika 4.38.), odnosno nalazi se na potencijalu od $E_{p,2} = -0,110 \text{ V}$, dok je vršna struja jednaka $0,077 \text{ μA}$. Nadalje, može se vidjeti val 3 koji je ranije karakteriziran kao oksidacijski val PIGE

u elektrolitu perklorne kiseline, a za kojeg je uočeno da raste u prisustvu astaksantina. Slabo je definiran i izražen val 6 koji se nalazi na vršnom potencijalu od 1,031 V sa vršnom strujom od 1,359 μA . Ovog vala nema na čistoj elektrodi, a pripisan je oksidaciji terminalnih hidroksilnih grupa astaksantina. Umetak na slici 4.44. omogućuje bolji uvid u oksidacijski val 2. S obzirom da se oksidacijski val 2 za kap ekstrakta iz ribe kokot nalazi na nešto negativnijem potencijalu od vala 2 kapi astaksantina (slika 4.38.), a da mu ne prethodi val 1 pri negativnijem potencijalu, ne može se sa sigurnošću isključiti mogućnost da se procesi kojima se pripisuju valovi 1 i 2 kod kapi astaksantina, ovdje zbivaju kod bliskih potencijala i daju jedan val. Razlog tome može biti niz interferencija uzrokovanih složenošću uzorka. Također, s obzirom da nema vidljivih valova 4 i 5 (slika 4.38.), moguće je da su ti valovi prekriveni valom 3 zbog toga što je koncentracija astaksantina u uzorku ribe kokot preniska. Najbolja indikacija prisustva astaksantina u uzorku je val 6, iako je isti slabo izražen. Treba napomenuti da uzorak može sadržavati i druge karotenoide kao što su zeaksantin, kantaksantin i tunaksantin²⁵⁶ i da svi mogu doprinostiti odzivu uzorka.

Pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz ribe losos (lat. *Salmo salar*) u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ prikazan je na slici 4.45., dok je SW voltamogram za mikropipetu ekstrakta iz ribe brancin (lat. *Dicentrarchus labrax*) prikazan na slici 4.46. Promatrajući odzive za obje ribe, ne mogu se uočiti oksidacijski valovi, izuzev vala 3 pri 0,4 V koji se, kao što je već ranije rečeno, pripisuje odzivu PIGE u elektrolitu perklorne kiseline. Ovakvi rezultati mogu se pripisati cijelom nizu uzročnika. Važno je napomenuti da je prilikom ekstrakcije uzorak ribe losos imao narančasto obojenje što je ukazivalo na uspješnu ekstrakciju karotenoida, primarno astaksantina, iz ovog uzorka. Međutim, riba losos poznata je po velikim količinama masti²⁵⁸ što je u ovom slučaju onemogućilo uspješnu i direktnu analizu karotenoida u ovoj vrsti uzorka. Uklanjanje masnoća uključuje proces saponifikacije ili esterifikacije¹⁰³, no s obzirom da je u ovom radu naglasak bio na brzom i jednostavnoj tehnici određivanja karotenoida, saponifikacija nije provedena. Nadalje, za uzorak brancina može se zaključiti da je ekstrahirana količina karotenoida bila ispod granice detekcije za ovu voltametrijsku tehniku.

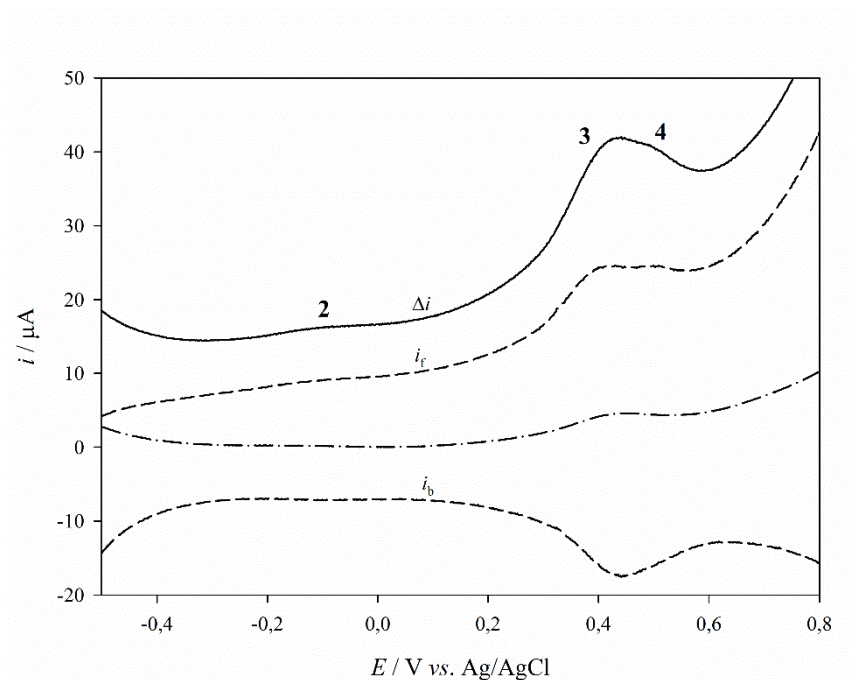


Slika 4.45. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe losos imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni val 3, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.



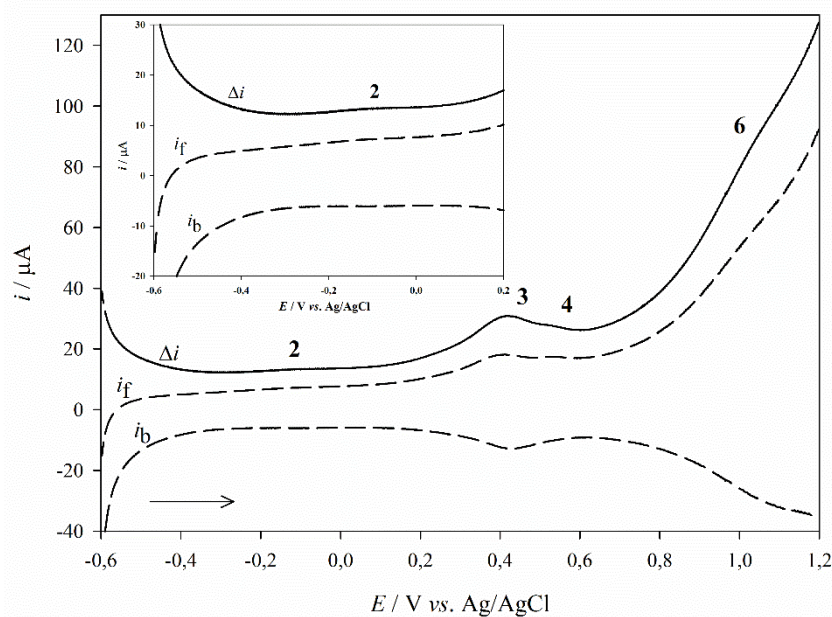
Slika 4.46. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe brancin imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni val 3, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Na slici 4.47. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz ribe trlje (lat. *Mullus barbatus barbatus*) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Na voltamogramu se mogu raspoznati tri oksidacijska vala. Reverzibilni široki val 2 i ovdje je označen s brojem 2 jer se nalazi blizu potencijalu vala 2 za kap astaksantina (slika 4.38.), odnosno nalazi se na vršnom potencijalu od $E_{p,2} = -0,110 \text{ V}$, na istom potencijalu kao i oksidacijski val 2 ribe kokot (slika 4.44.), dok je vršna struja jednaka $0,540 \text{ }\mu\text{A}$ što je oko 7 puta veća struja nego za isti oksidacijski val kod ribe kokot. Slaganje u ovom oksidacijskom valu upućuje na ekstrakciju istog karotenoida iz uzoraka riba kokota i trlje. I u ovom slučaju ne može se isključiti mogućnost da se procesi kojima se pripisuju odzivi valova 1 i 2 kod kapi astaksantina, ovdje zbivaju u jednom koraku. Nadalje, može se vidjeti val 3. Za razliku od voltamograma za ribu kokot, ovdje je vidljiv i slabo definiran val 4 na vršnom potencijalu, $E_{p,4} = 0,493 \text{ V}$ i vršne struje $i_{p,4} = 0,59 \text{ }\mu\text{A}$, dok se odziv vala 6 u ovom slučaju ne može zabilježiti.



Slika 4.47. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe trlje imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni valovi 2, 3, 4, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

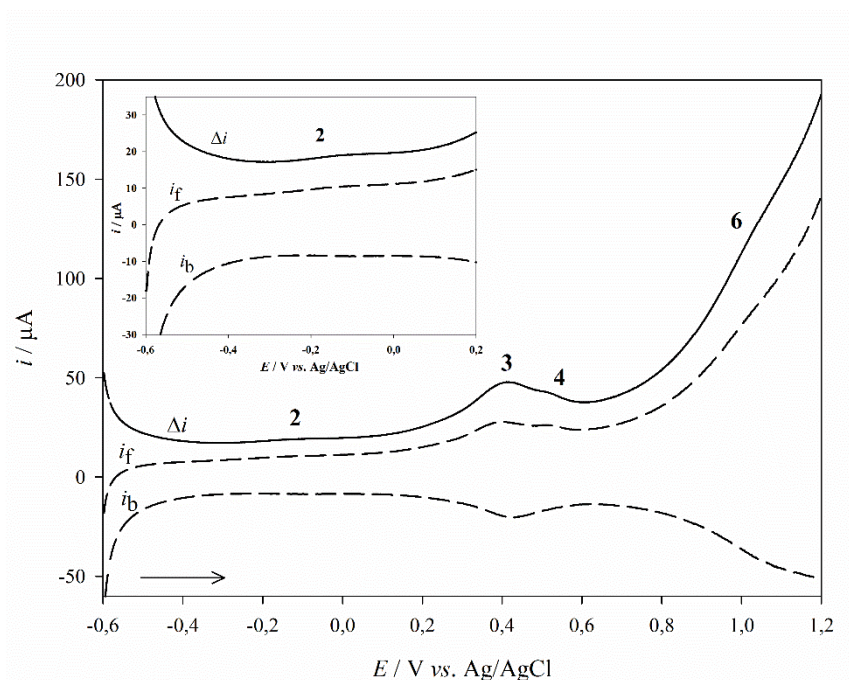
Na slici 4.48. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz ribe potočna pastrva (lat. *Salmo trutta*) u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄. Na voltamogramu se mogu primijetiti četiri oksidacijska vala. Val 2 pri vršnom potencijalu od -0,113 V sa vršnom strujom od 0,361 μA u slaganju je s prethodnim rezultatima za ribe kokot i trlju (slike 4.44. i 4.47.). Zatim je vidljiv val 3 koji je već prethodno objašnjen te nastavno na njega oksidacijski val 4 pri vršnom potencijalu od 0,524 V i slabo definiran val 6 pri vršnom potencijalu od 1,037 V.



Slika 4.48. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe potočna pastrva imobilizirane na PIGE i uronjene u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni valovi 2, 3, 4, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje. Umetak na slici: uvećani prikaz vala 2 za ukupni SWV odziv (Δi) te početnu (i_f) i povratnu (i_b) komponentu struje.

Usporedivi rezultati dobiveni su i za drugu vrstu pastrve, takozvanu kalifornijsku pastrvu (lat. *Oncorhynchus mykiss*). Pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz ribe kalifornijska pastrva u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ prikazan je na slici 4.49. Vršni potencijali i vršne struje odziva su gotovo identični onima dobivenima za potočnu pastrvu (slika 4.48.). Prema literaturi²⁵⁹ koncentracija astaksantina u kalifornijskoj pastrvi trebala bi biti relativno visoka (oko 50 mg kg⁻¹). Iako pravokutnovalni voltamogrami uzoraka pastrve odgovaraju voltamogramu kapi astaksantina (slika 4.38.), izostao je val 1 pri najnegativnijem potencijalu

prema kojem se provela kalibracija spomenute metode. Stoga se ne može sa sigurnošću reći radi li se o detektiranom astaksantinu u uzorcima.

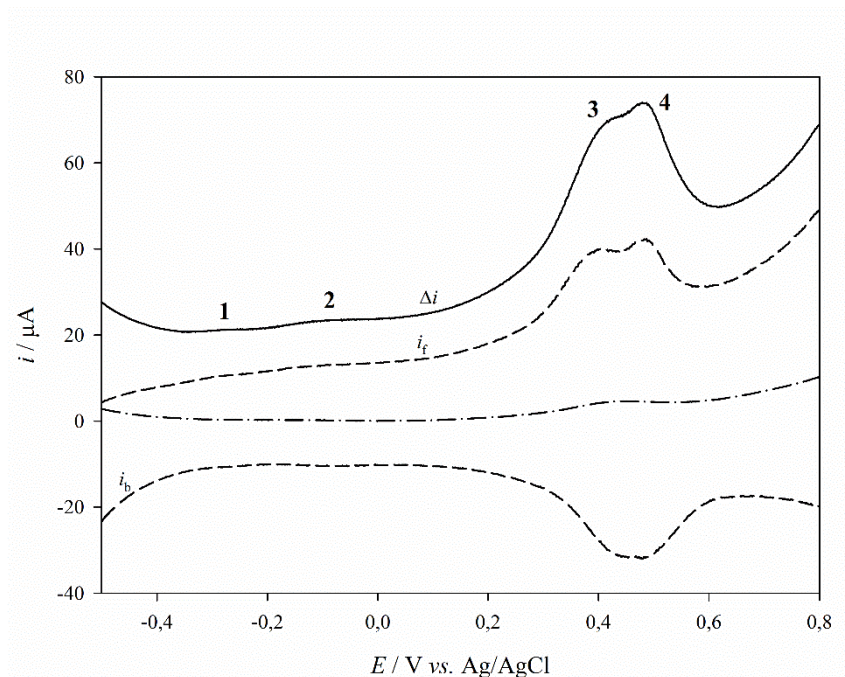


Slika 4.49. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz ribe kalifornijska pastrva imobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni valovi 2, 3, 4, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje. Umetak na slici: uvećani prikaz vala 2 za ukupni SWV odziv (Δi) te početnu (i_f) i povratnu (i_b) komponentu struje.

Na slici 4.50. prikazan je pravokutnovalni voltamogram dobiven za kap ekstrakta iz račića škampa (lat. *Nephrops norvegicus*) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Za razliku od prethodno dobivenih i opisanih voltamograma za ribe, ovdje se može primijetiti odziv reverzibilnog vala 1 na vršnom potencijalu od $-0,281 \text{ V}$. To je u slaganju sa odzivom vala 1 za kap astaksantina (tablica 4.5.) te je direktan indikator da je u ekstraktu škampa izolirani karotenoid upravo astaksantin. U korist ovoj pretpostavci idu i ostali dobiveni relevantni oksidacijski valovi, val 2 pri vršnom potencijalu $E_{p,2} = -0,118 \text{ V}$ i ireverzibilni val 4 pri vršnom potencijalu $E_{p,4} = 0,491 \text{ V}$.

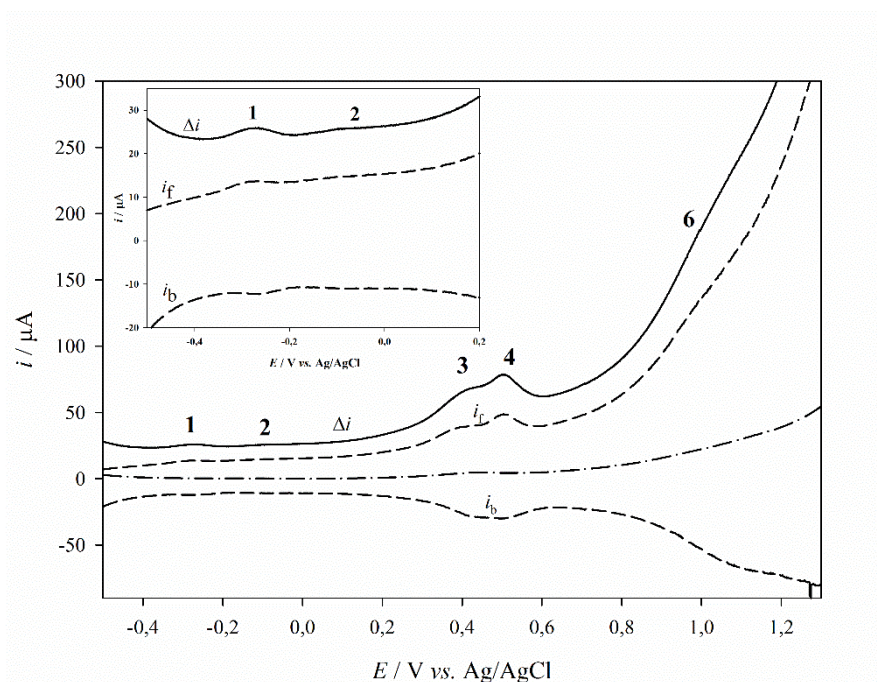
Slični rezultati dobiveni su i za račića kozicu (lat. *Aristeidae*), odnosno reverzibilni val 1 je prisutan na vršnom potencijalu od $-0,273 \text{ V}$, val 2 na potencijalu od $-0,106 \text{ V}$ te ireverzibilni oksidacijski val 4 na vršnom potencijalu od $0,505 \text{ V}$ što se može vidjeti na slici 4.51. Nadalje, kod kozice je zabilježen i slabo izraženi, široki val 6 na vršnom potencijalu od $0,993 \text{ V}$. Ovi

vršni potencijali odziva također se slažu s vršnim potencijalima odziva dobivenima za kap astaksantina (tablica 4.5.).



Slika 4.50. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz račića škampa immobilizirane na PIGE i uronjene u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje.

Ukoliko se uzme u obzir kalibracijska krivulja ovisnosti vršne struje o promjeni koncentracije dobivena za val 1 kapi astaksantina prikazane na slici 4.39., može se odrediti koncentracija karotenoida, u ovom slučaju astaksantina, u uzorcima škampa i kozica. Iz dobivene ovisnosti prikazane na slici 4.39. dobivene su molarne koncentracije astaksantina za navedene uzorke te iznose $16,12 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za uzorak škampa i $26,64 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za uzorak kozice. S obzirom da se izražavaju prema gramu mase uzorka, udio karotenoida u uzorcima škampa i kozice jednaki su $33,11 \mu\text{g g}^{-1}$ i $52,03 \mu\text{g g}^{-1}$ što je prikazano u tablici 4.8. Prema ovim rezultatima, uzorak škampa sadrži nešto manju količinu astaksantina u odnosu na uzorak kozice, no veću nego što je to zabilježeno u literaturi.²⁶⁰



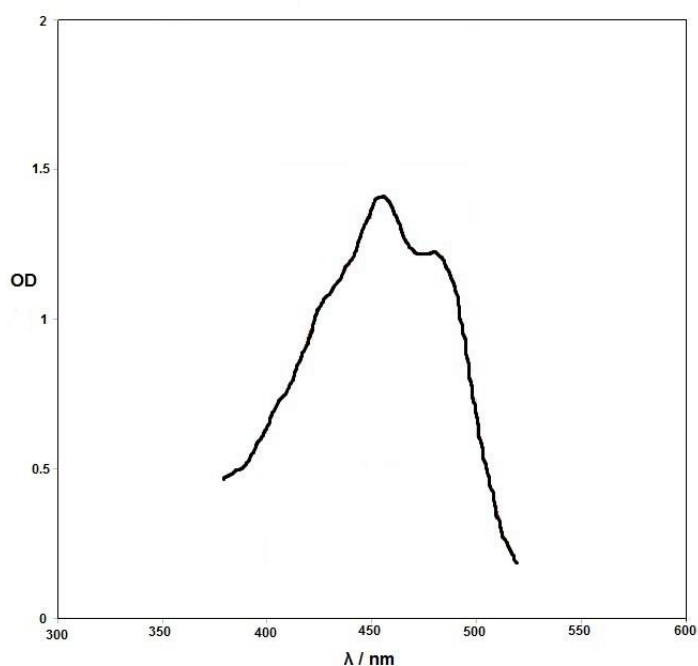
Slika 4.51. Pravokutnovalni voltamogram kapi ekstrakta iz račića kozice (poprečni presjek) imobilizirane na PIGE i uronjene u 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ te SWV odziv prazne elektrode (---). Ostali eksperimentalni uvjeti su kao na slici 4.44. Na slici su prikazani strujni valovi 1, 2, 3, 4, 6, ukupni SWV odziv (Δi) te početna (i_f) i povratna (i_b) komponenta struje. Umetak na slici: uvećani prikaz valova 1 i 2 za ukupni SWV odziv (Δi) te početnu (i_f) i povratnu (i_b) komponentu struje.

Tablica 4.8. Eksperimentalno dobivene koncentracije i maseni udjeli karotenoida u uzorcima ljuskara, kozica i škampa voltametrijom imobilizirane kapi.

Vrsta organizma	c (astaksantina) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Maseni udio astaksantina / $\mu\text{g g}^{-1}$
Kozica	26,64	52,03
Škamp	16,12	33,11

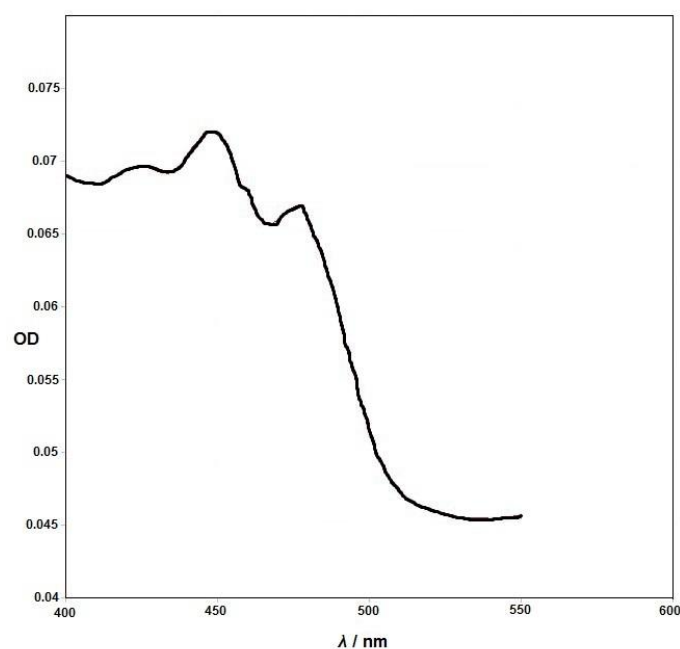
4.5. Spektrofotometrijska karakterizacija karotenoida

Na apsorpcijskom spektru raspona valnih duljina od 380 – 520 nm, β -karoten ima dva glavna apsorpcijska maksimuma – oba u plavom dijelu spektra (oko 455 nm i oko 480 nm) što se može vidjeti na slici 4.52. Ovakav spektar odgovara spektrima iz literature. Treba napomenuti da apsorpcijski maksimumi ovise o vrsti korištenog otapala te o osjetljivosti samog spektrofotometra.²⁶¹ Upravo zbog drugačijeg otapala može se objasniti manje odstupanje u apsorpcijskom spektru β -karotena, odnosno slabo definiran treći apsorpcijski maksimum pri 430 nm, za razliku od literature^{261, 262} gdje je u metanolu i heksanu prisutan treći apsorpcijski maksimum.



Slika 4.52. UV-vis apsorpcijski spektar dobiven za otopinu β -karotena u DMSO-u, koncentracije $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (380 – 520 nm).

Apsorpcijski spektar luteina, koncentracije $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, prikazan je na slici 4.53. Zabilježena su tri apsorpcijska maksimuma, oko 430 nm, 450 nm i 480 nm što je u skladu s literaturom gdje je apsorpcijski spektar dobiven u otapalima heksanu i metanolu.²⁶²



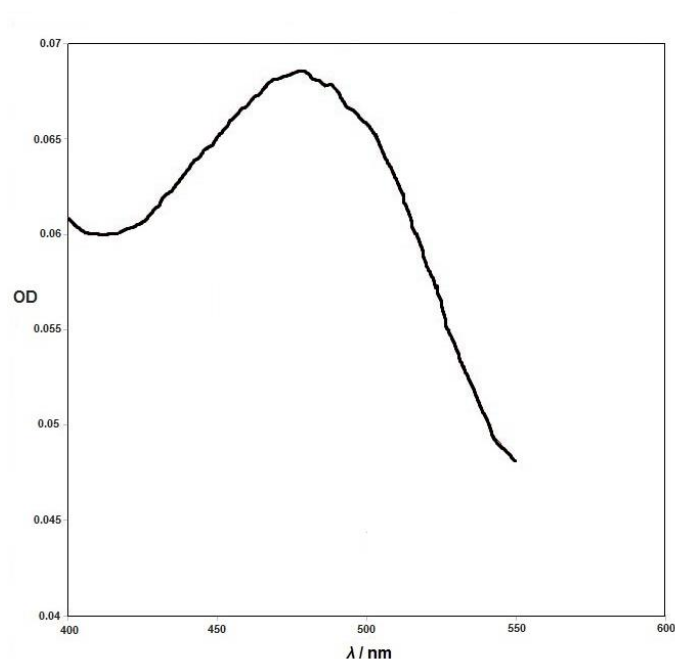
Slika 4.53. UV-Vis apsorpcijski spektar dobiven za otopinu luteina u DMSO-u, koncentracije $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (380 – 520 nm).

Nadalje, na slici 4.54. prikazan je apsorpcijski spektar astaksantina, koncentracije $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ s karakterističnim jednim apsorpcijskim maksimumom oko 480 nm. Ovaj maksimum je u slaganju s drugim apsorpcijskim maksimumom za β -karoten pa to predstavlja potencijalni problem u identifikaciji pojedinačnih karotenoida u uzorcima morskih organizama. Međutim, apsorpcijski maksimum β -karotena pri 455 nm bi trebao biti jače izražen od onog na 480 nm. Apсорpcijski spektar astaksantina jednak je apсорpcijskom spektru iz literature koji je mjeren u metanolu.²⁶⁴

Treba napomenuti da je prethodno svim mjerenjima određena apsorbancija čistog otapala, u ovom slučaju DMSO-a te oduzeta od svih dobivenih vrijednosti.

Na temelju ovih apsorpcijskih spektara konstruirani su kalibracijski pravci za ispitivane standarde, β -karoten pri 452 nm, lutein pri 454 nm i astaksantin pri 480 nm. β -karoten je ispitivan u rasponu koncentracija od $3,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, a linearnost odziva dobivena je u području od $3,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ do $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ te je dobiven kalibracijski pravac $y = 10591 x + 0,0019$, s koeficijentom korelacije $r = 0,999$. Lutein je ispitivan u rasponu koncentracija od $3,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1,03 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ i u tom području je dobiven linearan odnos između apsorbancije i koncentracije s kalibracijskim pravcem $y = 9092,7 x + 0,0188$ i koeficijentom korelacije $r = 0,999$. Astaksantin je ispitivan u rasponu

koncentracija od $2,5 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³ do $1,02 \cdot 10^{-3}$ mol dm⁻³ te je u istom području dobiven linearan odziv s kalibracijskim pravcem $y = 1092,6 x + 0,0045$ i koeficijentom korelacije $r = 0,995$. Od svih ispitivanih karotenoida, za astaksantin je dobiveno najšire područje linearnosti koncentracija. Ovako konstruirani kalibracijski pravci omogućili su daljnje određivanje ukupne količine karotenoida u uzorcima morskih organizama.



Slika 4.54. UV-Vis apsorpcijski spektar dobiven za otopinu astaksantina u DMSO-u, koncentracije $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ (380 – 520 nm).

Ekstrakti iz riba i račića koji su ispitivani prethodno opisanim voltametrijskim tehnikama, analizirani su i UV-Vis spektrofotometrijom na način da je 100 µL svakog uzorka preneseno u jažice spektrofotometrijskih pločica te je mjerena apsorbanca pri 452 nm i 480 nm s obzirom da se na tim valnim duljinama nalaze apsorpcijski maksimumi β-karotena i astaksantina koji se očekuju u ovim uzorcima. Međutim, važno je napomenuti da i drugi karotenoidi, kao što su zekasantin, violaksantin, neoksantin i drugi, pokazuju slične apsorpcijske maksimume²⁶⁵ što znači da se u uzorcima morskih organizama može isključivo govoriti o ukupnoj količini karotenoida (UKK) izraženoj u µg g⁻¹. U tablici 4.9. prikazane su navedene količine, no prikazane su i molarne koncentracije dobivene iz kalibracijskih krivulja za β-karoten ($\lambda = 452$ nm) i astaksantin ($\lambda = 480$ nm). Za ribu kokot spektrofotometrijski se nije mogla odrediti koncentracija ukupnih karotenoida. Razlog tome može biti preniska koncentracija karotenoida

u toj vrsti ribe koja bi se mogla mjeriti spektrofotometrijski, a i činjenica da je riba kupljena na lokalnoj tržnici od uzgajivača. Ostali uzorci ispitivanih morskih organizama sadržavali su određene količine karotenoida. Koncentracije pri $\lambda = 452$ nm rastu u nizu: potočna pastrva < kalifornijska pastrva < trlja < brancin < kozica < škamp < losos, dok koncentracije pri $\lambda = 480$ nm rastu u nizu: potočna pastrva < kalifornijska pastrva < trlja < brancin < losos < kozica < škamp. Odstupanje se odnosi na uzorak lososa, odnosno dobivena je veća količina karotenoida, nego za račiće kozicu i škampa. Ovo je direktno u vezi s višim apsorpcijskim maksimumom ekstrakta lososa pri $\lambda = 452$ nm.

Usporedbom rezultata dobivenih koncentracija spektrofotometrijskom analizom i elektrokemijskom tehnikom (voltametrija imobilizirane kapi) za račiće kozicu i škamp, može se vidjeti da su količine dobivene spektrofotometrijom do 20 puta veće. Ovo se može objasniti neselektivnošću spektrofotometrijske metode, odnosno određivanjem ukupne količine karotenoida u uzorku. Iako se radi o istom ekstraktu, kao što je ranije spomenuto, moguće je da su ekstrahirani i drugi karotenoidi iz ovih uzoraka koji imaju apsorpcijske maksimume pri istim valnim duljinama te pridonose ukupnoj količini karotenoida u uzorku. Zbog toga su u tablici 4.9. prikazani rezultati ukupnih količina karotenoida prema standardu astaksantina. Za razliku od ovoga, primjenom voltametrijskih tehnika, na slikama 4.50. i 4.51. mogu se vidjeti voltametrijski odzivi za ekstrakte iz račića škampa i kozice koji su u slaganju s voltametrijskim odzivom ispitivanog standarda astaksantina (slika 4.38.). Samim time, količina izražena u tablici 4.8. direktno odgovara odzivima vršnih struja za val 1 prisutan na slikama 4.50. i 4.51. koji je okarakteriziran kao glavni val elektrokemijske redoks reakcije astaksantina (slika 4.33.). Zbog toga je količina karotenoida dobivena mjerenjem voltametrijskom tehnikom niža od količine dobivene provedbom mjerenja spektrofotometrijom jer je voltametrijski kvantificiran astaksantin, a spektrofotometrijski svi karotenoidi prisutni u uzorku koji apsorbiraju pri 480 nm, odnosno voltametrijska tehnika se u ovom slučaju pokazala selektivnijom metodom.

Tablica 4.9. Eksperimentalno dobivene koncentracije karotenoida mjerene pri valnim duljinama $\lambda = 452$ nm i $\lambda = 480$ nm i ukupna količina karotenoida u uzorcima riba i račića izražena u $\mu\text{g g}^{-1}$.

Vrsta organizma	c (karotenoida) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ($\lambda = 452$ nm)	UKK* / $\mu\text{g g}^{-1}$ ($\lambda = 452$ nm)	c (karotenoida) / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ($\lambda = 480$ nm)	UKK* / $\mu\text{g g}^{-1}$ ($\lambda = 480$ nm)
Kokot**	-	-	-	-
Losos	7,58	166,31	41,14	1022,2
Brancin	1,49	2,63	20,23	40,49
Trlja	1,55	2,56	20,27	37,88
Potočna pastrva	0,03	0,04	6,08	9,43
Kalifornijska pastrva	0,29	0,39	7,23	10,97
Kozica	38,80	101,51	366,79	1087,0
Škamp	40,64	101,78	396,67	1125,2

* UKK – ukupna količina karotenoida u uzorku

** nije bilo moguće odrediti koncentraciju karotenoida u uzorku

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je elektrokemijska karakterizacija prirodnih antioksidativnih spojeva koji se nalaze u uzorcima biljnog i životinjskog porijekla, konkretno, kapsaicinoida (kapsaicina), koji su glavni spojevi odgovorni za ljutinu čili paprika, te karotenoida (β -karotena, luteina i astaksantina) koji se primarno koriste kao pigmenti u prehrambenoj industriji. Razvijene su i optimizirane voltametrijske tehnike koje su primijenjene za karakterizaciju kapsaicina u uzorcima čili paprika i karotenoida u uzorcima morskih organizama (ribama kokotu, lososu, brancinu, trlji, potočnoj i kalifornijskoj pastrvi te račićima škampu i kozici).

Svi uzorci ekstrahirani su u organskom mediju pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim valovima pri blago povišenoj temperaturi. Kapsaicinoidi su uspješno ekstrahirani pomoću etanola u kratkom vremenskom periodu od 20 minuta s visokom učinkovitošću, dok su karotenoidi najbolje ekstrahirani uz primjenu otapala dimetilsulfoksida i acetona.

Voltametrijska karakterizacija kapsaicina provedena je pomoću cikličke i pravokutnovalne voltametrije direktno na mikrokristalima kapsaicina imobiliziranih na površini parafinom impregnirane grafitne elektrode (PIGE). Elektrokemijski odziv ovog spoja objašnjava se oksidacijom hidroksilne skupine u benzenskom prstenu u strukturi kapsaicina. Minimalna količina kapsaicina koju je moguće odrediti bila je 10 ppm. Pravokutnovalna voltametrija mikrokristala čili paprika imobiliziranih na površini PIGE može se koristiti u procjeni ljutine čili paprika. Metoda se temelji na elektrooksidaciji kapsaicinoida u uzorcima čili paprika. Razvijeni senzor može raspoznati svih pet skupina podijeljenih prema ljutini (od ne ljutih do vrlo jako ljutih), odnosno na temelju struje se određuje ljutina određenog uzorka, no nije moguće raspoznati određenu vrstu čili paprike jer njezina ljutina može varirati u širokom rasponu i često dolazi do miješanja komercijalno dostupnih vrsta.

Metodom standardnog dodatka primijenjenom na voltametriju imobiliziranih mikrokristala, omogućena je kvantifikacija ukupnih karotenoida u uzorcima čili paprika.

Nadalje, metoda voltametrije imobiliziranog mikrofilma primijenjena je za analizu kapsaicina i uzoraka čili paprika, te je pokazala visoku selektivnost i osjetljivost za mali volumen analita.

Elektrokemijska karakterizacija karotenoida bila je nešto kompliciranija zbog velike osjetljivosti ovih spojeva na atmosferske uvjete (svjetlost, toplina, kisik) te izrazitu lipofilnost. Voltometrija imobiliziranih mikrokristala β -karotena, luteina i astaksantina nije se pokazala najuspješnijom metodom u njihovoj karakterizaciji. Nadalje, voltometrija imobiliziranog mikrofilma na PIGE i mCPE (minijaturiziranoj elektrodi od grafitne paste) dala je bolji uvid u elektrokemijsko ponašanje navedenih karotenoida u vodenom elektrolitu. Na temelju rezultata zaključeno je da se oksidacija β -karotena i luteina zbiva u jednom dvoelektronskom procesu koji uključuje molekule vode i kojim nastaju dioli, dok je elektrokemijski mehanizam astaksantina nešto složeniji proces koji uključuje redukciju konjugiranih keto skupina i oksidaciju dvostruke veze i hidroksilnih skupina. Elektroda mCP pokazala se osjetljivijom elektrodom od PIGE, no zbog manje površine, čistoća samog uzorka postaje bitna. Provedbom voltometrije imobilizirane kapi u dva elektrolita, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ i KNO_3 , razjašnjen je elektrooksidacijski mehanizam astaksantina. Mehanizam prvotno uključuje redoks reakciju karbonilne skupine na krajevima benzenskih prstena u strukturi astaksantina, slijede ih oksidacije do kation radikala i dikationa, a zatim oksidacija hidroksilnih skupina na krajevima molekule. Detaljna obrada elektrooksidacijskih mehanizama navedenih karotenoida pokazala se odličnom podlogom za karakterizaciju karotenoida u uzorcima morskih organizama koji se svakodnevno koriste u prehrani ljudi.

Elektrokemijske tehnike u analizi uzoraka riba omogućile su kvalitativnu primjenjivost, dok je u uzorcima račića škampa i kozica, uspješno kvantificirana količina astaksantina što je potvrđeno primjenom spektrofotometrijske tehnike. Usporedbom rezultata, može se zaključiti da se pomoću elektrokemijskih metoda uspješno odredio specifičan karotenoid u uzorcima morskih organizama dok su spektrofotometrijski određeni ukupni karotenoidi u uzorcima.

Na kraju se može zaključiti da je cilj istraživanja postignut, dobiven je bolji uvid u antioksidativna svojstva i djelovanje, odnosno reakcijske mehanizme odabranih antioksidansa. Značaj istraživanja je velik s obzirom da se radi o prirodnim antioksidansima koji usporavaju ili sprječavaju oksidaciju lako oksidirajućih biomolekula prisutnih u živim organizmima te da ovakva vrsta istraživanja lipofilnih molekula u vodenom mediju još do sada nije provedena. Na temelju detaljnih voltometrijskih analiza kapsaicinoida i karotenoida dobiveni su podaci o broju oksidacijskih i redukcijskih elektrodnih reakcija, reverzibilnosti, odnosno ireverzibilnosti elektrodnih procesa te o utjecaju pojedinih strukturnih grupa na elektrokemijska svojstva

ispitivanih prirodnih antioksidansa. Ovi rezultati doprinijeli su boljem razumijevanju oksidacijskih mehanizama kapsaicinoida prisutnih u čili paprikama i karotenoida u uzorcima morskih organizama. Razvijene elektrokemijske metode potencijalno predstavljaju alternativu drugim metodama analize koje su dugotrajnije i skuplje te omogućuju bržu analizu uzoraka što može naći primjenu u kontroli industrijskih procesa prilikom obrade proizvoda ili u očuvanju njegove kvalitete.

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

α	koeficijent prijelaza
CV	ciklička voltametrija
DMSO	dimetilsulfoksid
dE _{step}	korak potencijala stepenice
E	potencijal
E_{sw}	amplituda pravokutnog naponskog impulsa
F	Faradayjeva konstanta, C mol ⁻¹
f	frekvencija pravokutnog pulsnog signala
GCE	elektroda od staklastog ugljika
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
i	struja
λ	valna duljina, nm
LDL	lipoproteini niske gustoće
LOD	granica detekcije
LOQ	granica kvantifikacije
mCPE	minijaturizirana elektroda od grafitne paste
n	broj elektrona
PIGE	parafinom impregnirana grafitna elektroda
K_a	konstanta disocijacije kiseline
R	plinska konstanta, J mol ⁻¹ K ⁻¹
RNS	reaktivne dušikove vrste
ROS	reaktivne kisikove vrste
S	površina
SD	standardna devijacija
SHU	Scovillove jedinice ljutine
SWV	pravokutno valna voltametrija
T	temperatura, K
t_p	trajanje naponskog pulsa
TBAHFP	tetrabutilamonijev heksafluorofosfat
UKK	ukupna količina karotenoida

7. LITERATURNI IZVORI

7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Cadenas i L. Packer, *Handbook of antioxidants*, Marcel Dekker, Inc., New York, Second Edi., 2002.
2. J. Pokorny, N. Yanishlieva i M. Gordon, *Antioxidants in food - practical applications*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2001.
3. A. A. Hamid, O. O. Aiyelaagbe, L. A. Usman, O. M. Ameen i A. Lawal, *African J. Pure Appl. Chem.* **4** (2010) 142–151.
4. E. M. A. Dauqan, A. Abdullah i H. A. Sani, *Adv. J. Food Sci. Technol.* **3** (2011) 308–316.
5. S. K. Srivastava, *Role of Capsaicin in Oxidative Stress and Cancer*, Springer, Dordrecht, 2013.
6. J. Liang, Y. X. Tian, F. Yang, J. P. Zhang i L. H. Skibsted, *Food Chem.* **115** (2009) 1437–1442.
7. R. L. Prior, X. Wu i K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4290–4302.
8. J. H. Lee, J. D. Lim i M. G. Choung, *J. Funct. Foods* **5** (2013) 380–388.
9. G. K. Jayaprakasha, B. S. Jena, P. S. Negi i K. K. Sakariah, *Z. Naturforsch* **57c** (2002) 828–835.
10. A. Stalmach, W. Mullen, C. Nagai i A. Crozier, *Brazilian J. Plant Physiol.* **18** (2006) 253–262.
11. A. M. Pisoschi i G. P. Negulescu, *Biochem. Anal. Biochem.* **1** (2012) 1–10.
12. E. N. Frankel, *Antioxidants in food and biology - Facts and fiction*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2012.
13. H. Sies, *Exp. Physiol.* **82** (1997) 291–295.
14. D. J. Charles, *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*, Springer, 2013.
15. F. A. Carey i R. J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*, 2007.
16. M. S. Brewer, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10** (2011) 221–247.
17. B. Halliwell, *Biochem. Soc. Trans.* **35** (2007) 1147–1150.
18. C. Borek, *Sci. Med.* **4** (1997) 52–61.
19. M. Percival, *Clin. Nutr. insights* **31** (1998) 1–4.

20. V. S. Govindarajan, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **22** (1985) 109–176.
21. V. S. Govindarajan i M. N. Sathyanarayana, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29** (1991) 435–474.
22. H. Hamada, S. Ohiwa, T. Nishida, H. Katsuragi, T. Takeda, H. Hamada, N. Nakajima i K. Ishihara, *Plant Biotechnol.* **20** (2003) 253–255.
23. R. Arora, N. S. Gill, G. Chauhan i A. C. Rana, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **3** (2011) 280–286.
24. S. J. Conway, *Chem. Soc. Rev.* **37** (2008) 1530–1545.
25. M. De Lourdes Reyes-Escogido, E. G. Gonzalez-Mondragon i E. Vazquez-Tzompantzi, *Molecules* **16** (2011) 1253–1270.
26. A. R. Katritzky, Y. J. Xu, A. V. Vakulenko, A. L. Wilcox i K. R. Bley, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 9100–9104.
27. C. S. J. Walpole, S. Bevan, G. Bloomfield, R. Breckenridge, I. F. James, T. Ritchie, A. Szallasi, J. Winter i R. Wrigglesworth, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 2939–2952.
28. G. F. Barbero, J. M. G. Molinillo, R. M. Varela, M. Palma, F. A. Macías i C. G. Barroso, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 3342–3349.
29. R. Q. Thompson, K. W. Phinney, L. C. Sander i M. J. Welch, *Anal. Bioanal. Chem.* **381** (2005) 1432–1440.
30. R. Q. Thompson, K. W. Phinney, M. J. Welch i E. White, *Anal. Bioanal. Chem.* **381** (2005) 1441–1451.
31. N. Kozukue, J. S. Han, E. Kozukue, S. J. Lee, J. A. Kim, K. R. Lee, C. E. Levin i M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 9172–9181.
32. C. A. Reilly, D. J. Crouch, G. S. Yost i A. A. Fatah, *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 259–267.
33. C. A. Reilly, D. J. Crouch and G. S. Yost, *J. Forensic Sci.* **46** (2001) 502–509.
34. R. Kumar, N. Dwivedi, R. K. Singh, S. Kumar, V. P. Rai i M. Singh, *Int. J. Plant Breed. Genet.* **5** (2011) 99–110.
35. N. Nunn i N. Qian, *J. Econ. Perspect.* **24** (2010) 163–188.
36. B. C. N. Prasad, V. Kumar, H. B. Gururaj, R. Parimalan, P. Giridhar i G. A. Ravishankar, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103** (2006) 13315–13320.
37. B. C. Kang, S. H. Nahm, J. H. Huh, H. S. Yoo, J. W. Yu, M. H. Lee i B. D. Kim, *Theor. Appl. Genet.* **102** (2001) 531–539.

38. D. C. Goodwin i K. M. Hertwig, *Arch. Biochem. Biophys.* **417** (2003) 18–26.
39. B. M. Walsh i S. B. Hoot, *Int. J. Plant Sci.* **162** (2001) 1409–1418.
40. V. Supalkova, H. Stavelikova, S. Krizkova, V. Adam, A. Horna, L. Havel, P. Ryant, P. Babula i R. Kizek, *Acta Chim. Slov.* **54** (2007) 55–59.
41. A. González-Zamora, E. Sierra-Campos, J. G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J. C. R. Ortiz i J. L. García-Hernández, *Molecules* **18** (2013) 13471–13486.
42. G. F. Barbero, A. G. Ruiz, A. Liazid, M. Palma, J. C. Vera i C. G. Barroso, *Food Chem.* **153** (2014) 200–206.
43. N. Ruiz-Lau, F. Medina-Lara, Y. Minero-García, E. Zamudio-Moreno, A. Guzmán-Antonio, I. Echevarría-Machado i M. Martínez-Estévez, *HortScience* **46** (2011) 487–492.
44. D. DeWitt i P. W. Bosland, *The complete chile pepper book*, Timber Press, Portland, 2009.
45. M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine i D. Julius, *Nature* **389** (1997) 816–824.
46. K. R. Bley, *Expert Opin. Investig. Drugs* **13** (2004) 1445–1456.
47. B. F. Bessac i S. E. Jordt, *Physiology* **23** (2008) 360–380.
48. C. A. Reilly, D. J. Crouch i G. S. Yost, *J. Forensic Sci.* **46** (2001) 502–509.
49. C. A. Reilly i G. S. Yost, *Drug Metab. Rev.* **38** (2006) 685–706.
50. W. Robbins, *Clin. J. Pain* **16** (2000) 86–89.
51. A. Szallasi i P. M. Blumberg, *Adv. Pharmacol.* **23** (1993) 123–155.
52. A. Szallasi i P. M. Blumberg, *Pharmacol. Rev.* **51** (1999) 159–212.
53. A. Szallasi i G. Appendino, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 2717–2723.
54. Opinion of the Scientific Committee on Food on Capsaicin, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out120_en.pdf, (pristupljeno 1. siječnja 2017.).
55. S. Marques, N. G. Oliveira, T. Chaveca i J. Rueff, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **517** (2002) 39–46.
56. A. Saito i M. Yamamoto, *J. Toxicol. Sci.* **21** (1996) 195–200.
57. T. Glinsukon, V. Stitmunnaithum, C. Toskulkao, T. Buranawuti i V. Tangkrisanavinont, *Toxicol.* **18** (1980) 215–220.
58. L. K. Pershing, C. A. Reilly, J. L. Corlett i D. J. Crouch, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **200** (2004) 73–81.

59. D. Suresh i K. Srinivasan, *Indian J. Med. Res.* **131** (2010) 682–691.
60. T. Kawada i K. Iwai, *Agric. Biol. Chem.* **49** (1985) 441–448.
61. D. W. Cortright i A. Szallasi, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004) 1814–1819.
62. M. Tominaga i T. Tominaga, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **451** (2005) 143–150.
63. A. Morita, Y. Iwasaki, K. Kobata, T. Iida, T. Higashi, K. Oda, A. Suzuki, M. Narukawa, S. Sasakuma, H. Yokogoshi, S. Yazawa, M. Tominaga i T. Watanabe, *Life Sci.* **79** (2006) 2303–2310.
64. S. Bevan i J. Szolcsányi, *Trends Pharmacol. Sci.* **11** (1990) 330–333.
65. L. Fraenkel, S. T. Bogardus, J. Concato i D. R. Wittink, *Arch. Intern. Med.* **164** (2004) 1299–1304.
66. R. Remadevi i A. Szallasi, *IDrugs* **11** (2008) 120–132.
67. S. H. Oh, Y. S. Kim, S. C. Lim, Y. F. Hou, I. Y. Chang i H. J. You, *Autophagy* **4** (2008) 1009–1019.
68. N. H. Thoennissen, J. O’Kelly, D. Lu, G. B. Iwanski, D. T. La, S. Abbassi, A. Leiter, B. Karlan, R. Mehta i H. P. Koeffler, *Oncogene* **29** (2010) 285–296.
69. Z. H. Yang, X. H. Wang, H. P. Wang, L. Q. Hu, X. M. Zheng i S. W. Li, *Urology* **75** (2010) 735–741.
70. K. Ito, T. Nakazato, K. Yamato, Y. Miyakawa, T. Yamada, N. Hozumi, K. Segawa, Y. Ikeda i M. Kizaki, *Cancer Res.* **64** (2004) 1071–1078.
71. S. Báez, Y. Tsuchiya, A. Calvo, M. Pruyas, K. Nakamura, C. Kiyohara, M. Oyama i M. Yamamoto, *World J. Gastroenterol.* **16** (2010) 372–378.
72. J. Cui i J. Himms-Hagen, *Am. J. Physiol.* **262** (1992) 568–573.
73. J. I. Joo, D. H. Kim, J.-W. Choi i J. W. Yun, *J. Proteome Res.* **9** (2010) 2977–2987.
74. F. W. Leung, *Life Sci.* **83** (2008) 1–5.
75. H. C. Reinbach, A. Smeets, T. Martinussen, P. Møller i M. S. Westerterp-Plantenga, *Clin. Nutr.* **28** (2009) 260–265.
76. K. O. Shin i T. Moritani, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **53** (2007) 124–132.
77. N. Harada i K. Okajima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73** (2009) 1456–1459.
78. J. Peng i Y. J. Li, *Eur. J. Pharmacol.* **627** (2010) 1–7.
79. A. Zvara, P. Bencsik, G. Fodor, T. Csont, L. Hackler Jr., M. Dux, S. Furst, G. Jancso, L. G. Puskas i P. Ferdinandy, *FASEB J.* **20** (2006) 160–162.
80. M. J. Adams, K. D. K. Ahuja i D. P. Geraghty, *Thromb. Res.* **124** (2009) 721–723.

81. C. M. Hogaboam i J. L. Wallace, *Eur. J. Pharmacol.* **202** (1991) 129–131.
82. A. G. S. Harper, S. L. Brownlow i S. O. Sage, *J. Thromb. Haemost.* **7** (2009) 330–338.
83. K. D. K. Ahuja i M. J. Ball, *Br. J. Nutr.* **96** (2006) 239–242.
84. L. Wang, C. P. Hu, P. Y. Deng, S. S. Shen, H. Q. Zhu, J. S. Ding, G. S. Tan i Y. J. Li, *Planta Med.* **71** (2005) 416–419.
85. K. Nishihara, Y. Nozawa, M. Nakano, H. Ajioka i N. Matsuura, *Br. J. Pharmacol.* **135** (2002) 1487–1494.
86. Y. J. Surh i S. Sup Lee, *Life Sci.* **56** (1995) 1845–1855.
87. S. Liaaen-Jensen i B. F. Lutnæs, u *Carotenoids Volume 4: Natural Functions*, ur. G. Britton, S. Liaaen-Jensen i H. Pfander, 2008, vol. 4, str. 155–166.
88. D. B. Rodriguez-Amaya, *Food Carotenoids: Chemistry, Biology, and Technology*, John Wiley & Sons, Ltd., 2016.
89. G. Britton, *FASEB J.* **9** (1995) 1551–1558.
90. A. Schieber i R. Carle, *Trends Food Sci. Technol.* **16** (2005) 416–422.
91. C. Dugave i L. Demange, *Chem. Rev.* **103** (2003) 2475–2532.
92. S. Liaaen-Jensen, *Pure Appl. Chem.* **69** (1997) 2027–2038.
93. J. Von Laar, W. Stahl, K. Bolsen, G. Goerz i H. Sies, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **33** (1996) 157–162.
94. B. Bjerkeng i G. M. Berge, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **127** (2000) 423–432.
95. M. Østerlie i B. Bjerkeng, *J. Nutr. Biochem.* **2863** (2000) 482–490.
96. N. E. Craft i J. H. Soares, *J. Agric Food Chem.* **40** (1992) 431–434.
97. D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura, H. T. Godoy i J. Amaya-Farfan, *J. Food Compos. Anal.* **21** (2008) 445–463.
98. D. Hornero-Méndez i M. I. Mínguez-Mosquera, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 825–828.
99. Y. Peng, C. Ma, Y. Li, K. S. Y. Leung, Z. H. Jiang i Z. Zhao, *Plant Foods Hum. Nutr.* **60** (2005) 161–164.
100. C. N. Kobori i D. B. Rodriguez Amaya, *Food Nutr. Bull.* **29** (2008) 333–341.
101. D. B. Rodriguez-Amaya i M. Kimura, in *HarvestPlus Technical Monographs*, 2004, str. 59.
102. G. P. R. de Oliveira i D. B. Rodriguez-Amaya, *J. Food Sci.* **72** (2007) 79–85.

103. H. Lura i H. Saegrov, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48** (1991) 429–433.
104. B. Renstrøm, H. Rønneberg, G. Borch i S. Liaaen-Jensen, *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* **71B** (1982) 249–252.
105. F. Shahidi i J. A. Brown, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Crit. Rev. Food Sci.* **381** (1998) 1–67.
106. E. A. Johnson i G.-H. An, *Crit. Rev. Biotechnol.* **11** (1991) 297–326.
107. G. N. Coral-Hinostroza i B. Bjerkeng, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **133** (2002) 437–444.
108. X. Yan, Y. Chuda, M. Suzuki i T. Nagata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** (1999) 605–607.
109. K. Miyashita, S. Nishikawa, F. Beppu, T. Tsukui, M. Abe i M. Hosokawa, *J. Sci. Food Agric.* **91** (2011) 1166–1174.
110. E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas i P. Florou-Paneria, *J. Sci. Food Agric.* **93** (2013) 5–11.
111. G. Guglielmi, J. Lavaud, B. Rousseau, A. L. Etienne, J. Houmard i A. V. Rubant, *FEBS J.* **272** (2005) 4339–4348.
112. B. Liu i Y. Lee, *J. Appl. Phycol.* **12** (2000) 301–307.
113. R. A. Bone, J. T. Landrum, G. W. Hime, A. Cains i J. Zamor, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34** (1993) 2033–2040.
114. W. Stahl i H. Sies, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1740** (2005) 101–107.
115. K. Kirti, S. Amita, S. Priti, A. M. Kumar i S. Jyoti, *Adv. Biol.* **1** (2014) 1–13.
116. H. Hencken, *Poult. Sci.* **71** (1992) 711–717.
117. S. K. Gupta, A. K. Jha, A. K. Pal i G. Venkateshwarlu, *Nat. Prod. Radiance* **6** (2007) 46–49.
118. A. Vershinin, *Biofactors* **10** (1999) 99–104.
119. D. R. Giovannucci i R. S. Stephenson, *Vision Res.* **39** (1999) 219–229.
120. C. F. Herreid i S. M. Mooney, *J. Comp. Physiol. B* **154** (1984) 207–212.
121. W. I. Gruszecki i K. Strzałka, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1740** (2005) 108–115.
122. A. Sujak, W. Okulski i W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1509** (2000) 255–263.
123. W. Okulski, A. Sujak i W. I. Gruszecki, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1509**

- (2000) 216–228.
124. A. A. Woodall, G. Britton i M. J. Jackson, *Biochem. Soc. Trans.* **23** (1995) 133S.
125. G. W. Burton i K. U. Ingold, *Science* **224** (1984) 569–573.
126. N. I. Krinsky, *Free Radic. Biol. Med.* **7** (1989) 617–635.
127. N. I. Krinsky, *Nutrition* **17** (2001) 815–817.
128. R. Edge, D. J. McGarvey i T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B.* **41** (1997) 189–200.
129. C. S. Foote, Y. C. Chang i R. W. Denny, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 5216–5218.
130. J. T. Landrum, *Carotenoids Biological Functions and Properties*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 2010.
131. S. Kiokias i M. H. Gordon, *Food Rev. Int.* **20** (2004) 99–121.
132. A. J. Young i G. M. Lowe, *Arch. Biochem. Biophys.* **385** (2001) 20–27.
133. A. El-Agamey, G. M. Lowe, D. J. McGarvey, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott i A. J. Young, *Arch. Biochem. Biophys.* **430** (2004) 37–48.
134. L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 2409–2417.
135. S. A. Everett, M. F. Dennis, K. B. Patel, S. Maddix, S. C. Kundu i R. L. Willson, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 3988–3994.
136. A. Mortensen i L. H. Skibsted, *FEBS Lett.* **417** (1997) 261–266.
137. C. A. Rice-Evans, J. Sampson, P. M. Bramley i D. E. Holloway, *Free Radic. Res.* **26** (1997) 381–398.
138. A. Martinez, R. Vargas i A. Galano, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 12113–12120.
139. A. Mortensen, L. H. Skibsted i T. G. Truscott, *Arch. Biochem. Biophys.* **385** (2001) 13–19.
140. A. A. Woodall, G. Britton i M. J. Jackson, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1336** (1997) 575–586.
141. A. El-Agamey i D. J. McGarvey, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 3330–3340.
142. A. Mortensen i L. H. Skibsted, *FEBS Lett.* **426** (1998) 392–396.
143. A. V. Ruban, P. Horton i A. J. Young, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **21** (1993) 229–234.
144. P. Palozza, *Nutr. Rev.* **56** (1998) 257–265.
145. W. Stahl i H. Sies, *Mol. Aspects Med.* **24** (2003) 345–351.
146. T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **35** (1996) 233–235.

147. M. T. Schroeder, E. M. Becker i L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 3445–3453.
148. J. Shi, Q. Qu, Y. Kakuda, S. J. Xue, Y. Jiang, S. Koide i Y. Y. Shim, *J. Food Compos. Anal.* **20** (2007) 603–608.
149. W. Stahl, A. Junghans, B. De Boer, E. S. Driomina, K. Briviba i H. Sies, *FEBS Lett.* **427** (1998) 305–308.
150. R. M. Han, Y. X. Tian, E. M. Becker, M. L. Andersen, J. P. Zhang i L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 2384–2391.
151. R. M. Han, C. H. Chen, Y. X. Tian, J. P. Zhang i L. H. Skibsted, *J. Phys. Chem. A* **114** (2010) 126–132.
152. R. Liang, C. H. Chen, R. M. Han, J. P. Zhang i L. H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 9221–9227.
153. V. Batalova, E. Nabokova i A. Reger, u *AIP Conference Proceedings*, 2016, 1772, str. 50009-1-50009-5.
154. A. V. Ivanova, E. L. Gerasimova i K. Z. Brainina, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **45** (2015) 311–322.
155. J. Psotová, J. Zahálková, J. Hrbáč, V. Simánek i J. Bartek, *Biomed. Pap.* **145** (2001) 81–83.
156. M. Pohanka, H. Bandouchova, J. Sobotka, J. Sedlackova, I. Soukupova i J. Pikula, *Sensors* **9** (2009) 9094–9103.
157. C. H. V. Hoyle i J. H. Santos, *Int. Food Res. J.* **17** (2010) 937–946.
158. J. M. Brcanović, A. N. Pavlović, S. S. Mitić, G. S. Stojanović, D. D. Manojlović, B. M. Kaličanin i J. N. Veljković, *Food Technol. Biotechnol.* **51** (2013) 460–470.
159. J. F. Arteaga, M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado i J. M. Rodríguez-Mellad, *Molecules* **17** (2012) 5126–5138.
160. V. Mirčeski, Š. Komorsky-Lovrić i M. Lovrić, *Square-Wave Voltammetry - Theory and Application*, Springer, 2007.
161. F. Scheller i F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier B. V., Amsterdam, 1992.
162. S. Milardović, D. Iveković i B. S. Grabarić, *Bioelectrochemistry* **68** (2006) 175–180.
163. T. P. Tougas, J. M. Jannetti i W. G. Collier, *Anal. Chem.* **57** (1985) 1377–1381.
164. S. Milardović, D. Iveković, V. Rumenjak i B. S. Grabarić, *Electroanalysis* **17** (2005) 1847–1853.

165. S. Milardović, I. Kereković i V. Rumenjak, *Food Chem.* **105** (2007) 1688–1694.
166. J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Pohanka, T. Jurikova, O. Zitka, V. Adam, B. Klejdus i R. Kizek, *Int. J. Electrochem. Sci.* **8** (2013) 8464–8489.
167. L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas i I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.* **111** (2008) 61–66.
168. R. Kohen, D. Fanberstein i O. Tirosh, *Arch. Gerontol. Geriatr.* **24** (1997) 103–123.
169. S. Martinez, L. Valek, J. Rešetić i D. Ferenec Ružić, *J. Electroanal. Chem.* **588** (2006) 68–73.
170. R. C. Martins, R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo, V. V. Lopes, P. Guedes de Pinho, C. M. Oliveira i A. C. Silva Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 12092–12098.
171. D. C. McMillan, S. D. Sarvete, J. E. Oatis i D. J. Jollow, *Toxicol. Sci.* **82** (2004) 647–655.
172. A. Mittal, R. J. Flint, M. Fanous, B. Delahunt, P. A. Kilmartin, G. J. S. Cooper, J. A. Windsor i A. R. J. Phillips, *Crit. Care Med.* **36** (2008) 866–72.
173. A. S. Arribas, M. Martínez-Fernández i M. Chicharro, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **34** (2012) 78–95.
174. F. Scholz, L. Nitschke i G. Henrion, *Fresenius Zeitschrift für Anal. Chemie* **334** (1989) 56–58.
175. F. Scholz i B. Lange, *Trends Anal. Chem.* **11** (1992) 359–367.
176. P. Janeiro i A. M. O. Brett, *Electroanalysis* **17** (2005) 733–738.
177. Š. Komorsky-Lovrić i I. Novak, *Int. J. Electrochem. Sci.* **6** (2011) 4638–4647.
178. I. Novak, M. Šeruga i Š. Komorsky-Lovrić, *Food Chem.* **122** (2010) 1283–1289.
179. Š. Komorsky-Lovrić i I. Novak Jovanović, *Int. J. Electrochem. Sci.* **11** (2016) 836–842.
180. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Zagreb, 2010.
181. F. Jelen, A. Kourilova, S. Hason, R. Kizek i L. Trnkova, *Electroanalysis* **21** (2009) 439–444.
182. V. Adam, I. Fabrik, R. Kizek, V. Adam, T. Eckschlager, M. Stiborova i L. Trnkova, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **29** (2010) 409–418.
183. J. Wang, *Analytical electrochemistry*, Wiley-VCH, Second Edi., 2000, vol. 3.
184. A. J. Bard i L. R. Faulkner, *Electrochemical methods - Fundamentals and Applications*,

- John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.
185. D. Hynek, L. Krejcova, J. Sochor, N. Cernei, J. Kynicky, V. Adam, L. Trnkova, J. Hubalek, R. Vrba i R. Kizek, *Int. J. Electrochem. Sci.* **7** (2012) 1802–1819.
186. A. Mittal, F. Göke, R. Flint, B. P. T. Loveday, N. Thompson, B. Delahunt, P. A. Kilmartin, G. J. S. Cooper, J. MacDonald, A. Hickey, J. A. Windsor i A. R. J. Phillips, *Shock* **33** (2010) 460–466.
187. A. J. Blasco, A. González Crevillén, M. C. González i A. Escarpa, *Electroanalysis* **19** (2007) 2275–2286.
188. E. Laborda, A. Molina, Q. Li, C. Batchelor-McAuley i R. G. Compton, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14** (2012) 8319–8327.
189. X. Shan, S. Wang, W. Wang i N. Tao, *Anal. Chem.* **83** (2011) 7394–7399.
190. C. M. A. Brett, M. B. Q. Garcia i J. L. F. C. Lima, *Electroanalysis* **8** (1996) 1169–1173.
191. J. J. O'Connor i J. P. Lowry, *Eur. J. Pharmacol.* **686** (2012) 60–65.
192. E. Rozoy, S. Simard, Y. Liu, D. Kitts, J. Lessard i L. Bazinet, *Food Chem.* **132** (2012) 1429–1435.
193. S. Ren, F. H. Li i S. L. Ma, *Russ. J. Coord. Chem.* **38** (2012) 342–348.
194. D. Huska, J. Hubalek, V. Adam i R. Kizek, *Electrophoresis* **29** (2008) 4964–4971.
195. R. T. Kachoosangi, G. G. Wildgoose i R. G. Compton, *Analyst* **133** (2008) 888–895.
196. Y. Yardim, *Electroanalysis* **23** (2011) 2491–2497.
197. Y. Yardim i Z. Şentürk, *Talanta* **112** (2013) 11–19.
198. Y. Ya, L. Mo, T. Wang, Y. Fan, J. Liao, Z. Chen, K. S. Manoj, F. Fang, C. Li i J. Liang, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **95** (2012) 90–95.
199. E. P. Randviir, J. P. Metters, J. Stainton i C. E. Banks, *Analyst* **138** (2013) 2970–2981.
200. J. P. Metters, M. Gomez-Mingot, J. Iniesta, R. O. Kadara i C. E. Banks, *Sensors Actuators B* **177** (2013) 1043–1052.
201. A. P. Ruas de Souza, M. Bertotti, C. W. Foster i C. E. Banks, *Electroanalysis* **27** (2015) 2295–2301.
202. D. Liu, Y. Gao i L. D. Kispert, *J. Electroanal. Chem.* **488** (2000) 140–150.
203. D. Niedzwiedzki, J. F. Rusling i H. A. Frank, *Chem. Phys. Lett.* **415** (2005) 308–312.
204. A. Ligia Focsan, S. Pan i L. D. Kispert, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014) 2331–2339.
205. J. A. Jeevarajan i L. D. Kispert, *J. Electroanal. Chem.* **411** (1996) 57–66.
206. G. Gao, J. A. Jeevarajan i L. D. Kispert, *J. Electroanal. Chem.* **411** (1996) 51–56.

207. P. Hapiot, L. D. Kispert, V. V. Konovalov i J. M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 6669–6677.
208. V. G. Mairanovsky, A. A. Engovatov, N. T. Ioffe i G. I. Samokhvalov, *J. Electroanal. Chem.* **66** (1975) 123–137.
209. B. J. Foss, A. Ion, V. Partali, H. R. Sliwka i F. G. Banica, *J. Electroanal. Chem.* **593** (2006) 15–28.
210. Y. Yue, Q. Liang, Y. Liao, Y. Guo i S. Shao, *J. Electroanal. Chem.* **682** (2012) 90–94.
211. Z. He i L. D. Kispert, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 9038–9043.
212. G. K. F. Oliveira, T. F. Tormin, R. H. de O. Montes, E. M. Richter i R. A. A. Muñoz, *Electroanalysis* **28** (2016) 2143–2148.
213. A. Ion, V. Partali, H. R. Sliwka i F. Gabriel Banica, *Electrochem. commun.* **4** (2002) 674–678.
214. A. Doménech-Carbó, M. Martini, L. M. de Carvalho, C. Viana, M. T. Doménech-Carbó i M. Silva, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **80** (2013) 159–163.
215. M. A. Gulppi, N. Vejar, L. Tamayo, M. I. Azocar, C. Vera, C. Silva, J. H. Zagal, F. Scholz i M. A. Páez, *Electrochem. commun.* **41** (2014) 8–11.
216. F. Scholz, Š. Komorsky-Lovrić i M. Lovrić, *Electrochem. commun.* **2** (2000) 112–118.
217. G. F. Barbero, A. Liazid, M. Palma i C. G. Barroso, *Talanta* **75** (2008) 1332–1337.
218. Y. Li, F. Miao, Y. Geng, D. Lu, C. Zhang i M. Zeng, *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **30** (2012) 627–637.
219. A. Khanafari, A. Saberi, M. Azar, G. Vosooghi, S. Jamili i B. Sabbaghzadeh, *Iran J. Environ. Heal. Sci. Eng.* **4** (2007) 93–98.
220. W. L. Scoville, *J. Am. Pharm. Assoc.* **1** (1912) 453–454.
221. M. Y. Moridani, A. Siraki i P. J. O'Brien, *Chem. Biol. Interact.* **145** (2003) 213–223.
222. M. A. N. Manaia, V. C. Diclescu, E. D. S. Gil i A. M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.* **682** (2012) 83–89.
223. Š. Komorsky-Lovrić i B. Nigović, *J. Electroanal. Chem.* **593** (2006) 125–130.
224. Š. Komorsky-Lovrić, *J. Solid State Chem.* **1** (1997) 94–99.
225. Y. Samet, R. Abdelheidi i A. Savall, *Phys. Chem. News* **8** (2002) 89–99.
226. F. J. J. Vermillion i I. A. Pearl, *J. Electrochem. Soc.* **111** (1964) 1392–1399.
227. Y. Samet, D. Kraiem i R. Abdelhédi, *Prog. Org. Coatings* **69** (2010) 335–343.
228. http://www.chilliworld.com/FactFile/Scoville_Scale.asp. (pristupljeno 15.02.2018.)

229. <http://www.scufoods.com/>. (pristupljeno 15.02.2018.)
230. U. Schröder, K. B. Oldham, J. C. Myland, P. J. Mahon i F. Scholz, *J. Solid State Electrochem.* **4** (2000) 314–324.
231. A. Doménech-Carbó, S. Sánchez-Ramos, D. J. Yusá-Marco, M. Moya-Moreno, J. V. Gimeno-Adelantado i F. Bosch-Reig, *Anal. Chim. Acta* **501** (2004) 103–111.
232. Š. Komorsky-Lovrić, V. Mirčeski i F. Scholz, *Mikrochim. Acta* **132** (1999) 67–77.
233. K. G. Sweat, J. Broatch, C. Borrer, K. Hagan i T. M. Cahill, *Food Chem.* **210** (2016) 606–612.
234. L. Orellana-Escobedo, L. E. Garcia-Amezquita, G. I. Olivas, J. J. Ornelas-Paz i D. R. Sepulveda, *CyTA - J. Food* **11** (2013) 179–184.
235. I. Novak Jovanović, L. Čižmek i Š. Komorsky-Lovrić, *Electrochim. Acta* **208** (2016) 273–281.
236. B. Estrada, F. Pomar, J. Díaz, F. Merino i M. A. Bernal, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **73** (1998) 493–497.
237. M. Monforte-González, A. Guzmán-Antonio, F. Uuh-Chim i F. Vázquez-Flota, *J. Sci. Food Agric.* **90** (2010) 764–768.
238. M. Gulppi, J. Pavez, J. H. Zagal, M. Sancy, M. Azocar, F. Sholtz i M. A. Páez, *J. Electroanal. Chem.* **745** (2015) 61–65.
239. T. F. Tormin, D. T. Gimenes, L. G. Silva, R. Ruggiero, E. M. Richter, V. S. Ferreira i R. A. A. Muñoz, *Talanta* **82** (2010) 1599–1603.
240. M. Lovrić, Š. Komorsky-Lovrić i R. W. Murray, *Electrochim. Acta* **33** (1988) 739–744.
241. C. S. Boon, D. J. McClements, J. Weiss i E. A. Decker, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50** (2010) 515–532.
242. W.-D. Woggon, *Pure Appl. Chem.* **74** (2002) 1397–1408.
243. A. Lababpour i C.-G. Lee, *J. Biosci. Bioeng.* **101** (2006) 104–110.
244. M. Ribani, C. H. Collins i C. B. G. Bottoli, *J. Chromatogr. A* **1156** (2007) 201–205.
245. G. Tiwari i R. Tiwari, *Pharm. meth.* **1** (2010) 25–38.
246. I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela i F. M. Goycoolea, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46** (2006) 185–196.
247. R. R. Ambati, P. S. Moi, S. Ravi i R. G. Aswathanarayana, *Mar. Drugs* **12** (2014) 128–152.
248. R.-M. Han, Y.-X. Tian, Y.-S. Wu, P. Wang, X.-C. Ai, J.-P. Zhang i L. H. Skibsted,

- Photochem. Photobiol.* **82** (2006) 538–546.
249. E. Yamashita, *Funct. Foods Heal. Diseaseas* **3** (2013) 254–258.
250. M. Zeeshan, H. R. Sliwka, V. Partali i A. Martínez, *Tetrahedron Lett.* **53** (2012) 4522–4525.
251. I. Novak, M. Šeruga i Š. Komorsky-Lovrić, *Electroanalysis* **21** (2009) 1019–1025.
252. J. C. Myland i K. B. Oldham, *Anal. Chem.* **72** (2000) 3972–3980.
253. C. Turgut, B. M. Newby i T. J. Cutright, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **11** (2004) 7–10.
254. S. Rivera i R. Canela, *Molecules* **17** (2012) 11255–11268.
255. G. Scita, *J. Nutr. Biochem.* **3** (1992) 124–128.
256. B. Bjerkeng, u *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.*, ur. R. Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia- Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, Mérida, Yucatán, 2000, str. 71–89.
257. S. Tolasa, S. Cakli i U. Ostermeyer, *Eur. Food Res. Technol.* **221** (2005) 787–791.
258. P. Katikou, S. I. Hughes i D. H. F. Robb, *Aquaculture* **202** (2001) 89–99.
259. G. I. Page i S. J. Davies, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **143** (2006) 125–32.
260. S. Yamada, Y. Tanaka, M. Sameshima i Y. Ito, *Aquaculture* **87** (1990) 323–330.
261. H. K. Lichtenthaler, *Methods Enzymol.* **148** (1987) 350–382.
262. L. Y. Zang, O. Sommerburg i F. J. G. M. Van Kuijk, *Free Radic. Biol. Med.* **23** (1997) 1086–1089.
263. B. Tan i D. N. Soderstrom, *J. Chem. Educ.* **66** (1989) 258–260.
264. D. Tokarz, R. Cisek, O. El-Ansari, G. S. Espie, U. Fekl i V. Barzda, *PLoS One* **9** (2014) 1–8.
265. H. K. Lichtenthaler i C. Buschmann, *Curr. Prot. Food Anal. Chem.* **8** (2001) 1–2.

8. ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Lara Čižmek rođena je 20. lipnja 1990. u Zagrebu. Ovdje je završila osnovnu i srednju školu te je 2009. godine upisala preddiplomski, a 2012. godine i diplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Diplomirala je 2014. godine u klasi 10% najboljih studenata te je stekla titulu magistra inženjerka ekoinženjerstva obranivši diplomski rad pod nazivom „Biorazgradnja farmaceutika s različitim mikrobnim kulturama“. Dobitnica je Dekanove nagrade za znanstveni rad (2013.). U siječnju 2015. godine zaposlila se na Institutu Ruđer Bošković kao stručni suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) pod nazivom „Projekt razvoja karijere mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti“, a 2017. godine prelazi na radno mjesto asistenta na istom projektu. Zaposlena je u sklopu znanstvenog projekta „Razvoj voltametrijskih metoda za karakterizaciju prirodnih antioksidansa“ HrZZ-a unutar kojeg radi doktorsku disertaciju i upisuje poslijediplomski studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Od 2017. godine upisana je u registar istraživača Ministarstva znanosti i tehnologije, pod matičnim brojem 360046. Tijekom zaposlenja kandidatkinja Lara Čižmek je, s ciljem usavršavanja, sudjelovala na međunarodnoj školi „11th PTASchool of Electrochemistry“ u São Paulu, Brazil, u prosincu 2016. godine te je preko programa Central European Exchange Program for University Studies (CEEPUS) 2018. godine bila na jednomjesečnom usavršavanju na Zdravstvenom fakultetu na Sveučilištu u Ljubljani, Slovenija.

Od 2015. godine sudjeluje u popularizaciji znanosti kao sudionik na Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković, a od 2016. članica je organizacije International Society of Electrochemistry. Od 2017. godine predstavnica je asistenata Zavoda za kemiju materijala u Vijeću asistenata Instituta Ruđer Bošković.

Do sada, kao koautor objavila je 5 znanstvenih radova u časopisima koji su referirani u svjetskim bazama podataka, od kojih se 4 citira u bazi Current Contents. Također, objavila je 1 rad u zbornicima radova sa međunarodnog znanstvenog skupa te 1 popularan rad. Ukupno je sudjelovala na tri međunarodna i pet domaćih kongresa.